

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA I



NUEVOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA SINTASA DE ÁCIDOS GRASOS
(FASN)

VALIDACIÓN COMO DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE MAMA

TESIS DOCTORAL:

CARLOS TURRADO GARCÍA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**MARÍA LUZ LÓPEZ RODRÍGUEZ
BELLINDA BENHAMÚ SALAMA
SILVIA ORTEGA GUTIÉRREZ**

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I



**NUEVOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA SINTASA DE
ÁCIDOS GRASOS (FASN): VALIDACIÓN COMO DIANA
TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE MAMA**

Doctorando

Carlos Turrado García

Directoras:

Dra. M^a Luz López Rodríguez

Dra. Bellinda Benhamú Salama

Dra. Silvia Ortega Gutiérrez

MADRID, 2013

“Y aquella mujer, levantando la tapa de un gran vaso que tenía en sus manos esparció sobre los hombres las miserias horribles. Únicamente la Esperanza quedó en el vaso, detenida en los bordes, y no echó a volar porque Pandora había vuelto a cerrar la tapa...”

Los trabajos y los días. Hesiodo

A quienes son sacudidos por el cáncer

*El presente trabajo ha sido realizado en el laboratorio de Química Médica en el Departamento de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la supervisión de la catedrática **Dra. M^a Luz López Rodríguez** y las profesoras **Dra. Bellinda Benhamú Salama** y **Dra. Silvia Ortega Gutiérrez** a quienes deseo expresar mi más profundo agradecimiento por su acogida en este grupo de investigación, por sus continuas enseñanzas a lo largo de todo este tiempo, y muy especialmente, por todo el ánimo, apoyo y confianza depositada en este proyecto.*

Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento:

Al Dr. Ramón Colomer del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas y a la Dra. María Teresa Puig del Centro de Investigaciones Oncológicas de Gerona, por la supervisión de las pruebas biológicas. A Glòria Oliveras por enseñarme a realizar los ensayos celulares y de inhibición de la actividad de FASN.

Al Profesor Dr. Guillermo Orellana Moraleda, por su admisión en el Departamento de Química Orgánica I de la Universidad Complutense de Madrid y a Soledad Martínez Real, secretaria del Departamento, por su inestimable ayuda a lo largo de estos años.

A los Catedráticos Dr. Diego Armesto Vilas y Dra. M^a José Ortiz García por acogerme en su laboratorio y a la Dra. Mar Martín-Fontecha Corrales por iniciarme en la investigación durante mis estudios de licenciatura.

A todos mis compañeros de laboratorio, porque he vivido unos años que jamás olvidaré, con vosotros los éxitos han sido más dulces y los fracasos apenas amargaron. A los que me acogieron tan cariñosamente en mi último año de carrera para realizar el proyecto: Marga, Ángel, Tania, Rocío y José, con los que ahora me une una fuerte amistad. A Mar, porque no dejo de aprender de ella. A Lidia, que ha sido como una hermana para mí. A los que llegaron un poco después: Moisés, Dulce, por su energía tan contagiosa, Inés, por tener siempre una palabra de ánimo, Anita, por enseñarme el valor de los principios, Marta, mi compañera de vitrina durante los últimos años y que tanta paciencia ha tenido conmigo, Nono y Henar. A las estudiantes: Marisa, Fátima y Samanta, a las que también quiero recordar. A las personas que mantienen el excelente nivel tanto profesional como personal del laboratorio de química médica: Débora, Ainoa, Paco y Gloria. A los estudiantes que he tenido el honor de codirigir sus proyectos de licenciatura y que tanto me han enseñado: Nuria y especialmente a Javi. A los

técnicos de laboratorio Carolina y, cómo no, a Jorge porque me ha ayudado enormemente. Y por último a Laura, con quien tan buenos momentos he pasado.

A mis amigos porque, a pesar de haberlos descuidado durante largos períodos en la tesis, siempre han estado ahí.

A mis padres, a mis hermanos Marta, Pablo, Fernando y Ana, a mi tía Teresa y a mi sobrino Jaime, porque son el pilar que me sostiene y porque su cariño ha sido el motor que me ha permitido realizar este proyecto.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Enzima sintasa de ácidos grasos (FASN).	4
1.2. FASN como diana terapéutica en cáncer.	8
1.3. Inhibidores de FASN.	11
1.3.1. <i>El inhibidor natural cerulenina.</i>	12
1.3.2. <i>El inhibidor sintético C75 y derivados.</i>	13
1.3.3. <i>El inhibidor natural EGCG.</i>	15
1.3.4. <i>Otros inhibidores de origen natural.</i>	17
1.3.5. <i>Otros inhibidores sintéticos.</i>	17
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	19
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.1. Búsqueda de <i>hits</i>.	25
3.1.1. <i>Síntesis de los compuestos 1-4.</i>	25
3.1.2. <i>Determinación de la capacidad para inhibir la proliferación de células tumorales y la actividad de FASN.</i>	27
3.2. Optimización de los <i>hits</i>. Proceso <i>hit to lead</i>.	29
3.2.1. <i>Optimización de la reacción de esterificación mediante la aplicación de reactivos soportados.</i>	29
3.2.2. <i>Modificación de la subunidad cíclica.</i>	34
3.2.3. <i>Modificaciones en el espaciador.</i>	37
3.2.4. <i>Estudio de la influencia de los grupos hidroxilo.</i>	44
3.2.5. <i>Capacidad para inhibir la proliferación de células tumorales y la actividad de FASN.</i>	49
3.3. Caracterización farmacológica de los <i>leads</i>.	54
3.3.1. <i>Contribución de la inhibición de la actividad de FASN a la citotoxicidad celular.</i>	54
3.3.2. <i>Estudio de citotoxicidad en un panel de líneas tumorales.</i>	55
3.3.3. <i>Estudio del mecanismo molecular de la muerte celular y rutas de señalización.</i>	57

3.3.4. Efecto sobre la enzima CPT-1 y pérdida de peso a corto plazo in vivo.	59
3.4. Estudio de la toxicidad y de las propiedades farmacológicas.	60
3.4.1. Toxicidad in vivo de los leads.	60
3.4.2. Estabilidad in vitro.	64
3.4.3. Propiedades farmacocinéticas in vivo.	65
3.5. Determinación de la eficacia antitumoral.	67
3.5.1. Modelo in vivo.	67
3.5.2. Modelos celulares: resistencia a agentes quimioterapéuticos en uso.	68
4. CONCLUSIONES	71
5. PARTE EXPERIMENTAL	75
5.1. Química.	77
5.1.1. Síntesis de los compuestos finales 1-4 .	78
5.1.2. Síntesis de los compuestos finales 40-61, 91-94 y 110-118 .	83
5.1.3. Síntesis de los compuestos finales 65 y 66 .	130
5.1.4. Síntesis del compuesto final 73 .	133
5.1.5. Síntesis de los compuestos finales 83 y 84 .	137
5.2. Bioquímica.	144
5.2.1. Ensayo de citotoxicidad.	144
5.2.2. Ensayo de actividad enzimática de FASN.	145
5.2.3. Silenciado del gen de FASN por medio de un ARN pequeño interferente (small-interfering RNA, siRNA).	145
5.2.4. Análisis de los niveles de expresión de p185HER2/neu, fosfo-p185HER2/neu, ERK1/2, fosfo-ERK1/2, AKT, fosfo-AKTSer473, PARP y FASN.	145
5.2.5. Estabilidad en suero.	146
6. BIBLIOGRAFÍA	147
7. SUMMARY	157
ANEXO	165

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Se han utilizado las abreviaturas y acrónimos recomendados por la *American Chemical Society*, revisados en las revistas *Journal of Organic Chemistry* (http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/joceah/joceah_authguide.pdf) y *Journal of Medicinal Chemistry* (http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/jmcmar/jmcmar_abbreviations.pdf), de Enero de 2013 empleándose adicionalmente los indicados a continuación.

ACC	acetil-CoA carboxilasa
AKT	proteína quinasa B
All	alilo
ALP	fosfatasa alcalina
ALT	alanino aminotransferasa
AST	aspartato aminotransferasa
BNIP3	proteína de interacción 3 BCL2/E1B de adenovirus de 19 kDa
C	catequina
c.c.f.	cromatografía en capa fina
C ₀	concentración inicial
CAI	centro de asistencia a la investigación
Cl ₃₀	concentración inhibitoria treinta
CL ₀	aclaramiento del plasma (<i>clearance</i>)
CPT-1	carnitina palmitoiltransferasa 1
DAPK2	proteína quinasa asociada a muerte 2
DH	deshidratasa
DIC	diisopropilcarbodiimida
DIEA	diisopropiletilamina
DMBA	ácido 1,3-dimetilbarbitúrico
E.E.	error estándar
ECG	(-)-galato de epicatequina ((-)- <i>epicatechin gallate</i>)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EGC	(-)-epigallocatequina ((-)- <i>epigallocatechin</i>)
EGCG	(-)-galato de epigallocatequina ((-)- <i>epigallocatechin gallate</i>)
ER	enoilreductasa
ERBB o HER	receptor del factor de crecimiento humano epidérmico (<i>human epidermal growth factor receptor</i>)
FASN	sintasa de ácidos grasos (<i>fatty acid synthase</i>)
FBS	suero bovino fetal
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
KR	β-cetoacilreductasa

KS	β -cetoacilsintasa
MAT	malonil-acetiltransferasa
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
N.D.	no determinado
N.I.	no ejerce inhibición
PARP	poli(ADP-ribosa) polimerasa
PS	unido a la resina (<i>polymer supported</i>)
PUFAs	ácidos grasos poliinsaturados (<i>polyunsaturated fatty acids</i>)
S. C.	subunidad cíclica
siRNA	ARN pequeño interferente (<i>small interferent RNA</i>)
SREBP-1c	proteína de unión a elementos esteroideos 1c (<i>sterol regulatory element-binding protein 1c</i>)
t.a.	temperatura ambiente
TE	tioesterasa
TRAIL	ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral
UCM	Universidad Complutense de Madrid
USP2a	proteasa específica de ubiquitina
V _D	volumen de distribución

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades más extendidas y con mayor dificultad de curación. Se trata de la segunda causa de mortalidad, sólo detrás de las muertes producidas por enfermedades cardiovasculares y el número total de casos diagnosticados aumenta año tras año debido al crecimiento demográfico y al envejecimiento de la población. Esta patología consiste en un crecimiento descontrolado de células, las cuales adquieren la capacidad de invadir el órgano donde se originaron, viajar por la sangre y líquidos linfáticos hasta órganos más alejados y crecer nuevamente en ellos. El origen de esta enfermedad se ha vinculado a varios factores de riesgo como son el tabaquismo, la edad y el sexo del paciente, la exposición a agentes carcinogénicos o a radiación ionizante, el exceso de peso, el alcoholismo y determinados factores genéticos hereditarios.

Los diferentes tipos de cáncer se clasifican en función del tejido a partir del cual se originan las células tumorales. De todos ellos, el cáncer de mama es el más común entre las mujeres, ya que representa un 16% de los casos diagnosticados, mientras que se considera un cáncer raro en los varones (únicamente el 1% de los carcinomas de mama diagnosticados). La tasa de supervivencia varía en función del grado de desarrollo del país, desde un 80% en los países más desarrollados hasta un 40% en los países con menor índice de desarrollo. Esto es debido a que tanto los equipos utilizados para el diagnóstico como los medios requeridos para el tratamiento de la enfermedad suponen una gran cantidad de recursos económicos.

En lo referente al tratamiento del cáncer de mama, las terapias aplicadas son las siguientes: cirugía, consistente en la extracción quirúrgica del tumor y de los ganglios linfáticos afectados; radioterapia, basada en la aplicación de radiación

ionizante en la zona de la lesión con el fin de eliminar las células tumorales; quimioterapia, en la cual se administran fármacos con efectos citotóxicos sobre las células del tumor y, por último, terapia hormonal, en la que principalmente se persigue reducir los niveles de estrógenos, hormonas que estimulan el crecimiento del cáncer de mama. En la lucha contra esta enfermedad se utiliza frecuentemente una combinación de las cuatro terapias mencionadas anteriormente para lograr así un mayor índice de curación y a su vez un menor índice de recurrencia. Asimismo, los tratamientos de quimioterapia usados habitualmente implican la administración simultánea de varios fármacos, cuyas combinaciones óptimas se seleccionan en función de las características celulares concretas de cada tumor.^{1,2}

Aunque desde mediados del siglo XX hasta nuestros días se ha producido un gran avance en el tratamiento de esta enfermedad aún hay tipos de cáncer de mama que presentan una elevada dificultad de curación y en ocasiones, hay lesiones en las que se desarrolla resistencia a los tratamientos existentes. Así, tanto el desarrollo de nuevos fármacos como la validación de nuevas dianas terapéuticas en cáncer de mama son temas de gran relevancia dentro del campo de la química médica. En este sentido, la enzima sintasa de ácidos grasos (FASN, *fatty acid synthase*, E.C.2.3.1.85.) se ha propuesto recientemente como una posible diana terapéutica en el tratamiento de esta enfermedad.

1.1. Enzima sintasa de ácidos grasos (FASN).

Uno de los cambios metabólicos que sufren las células en la transformación oncogénica es el aumento de la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Esta biosíntesis implica a más de veinticinco enzimas, siendo la ruta metabólica principal la que incluye las siguientes (Figura 1A): la citrato liasa-ATP, que genera acetil-coenzima A (acetil-CoA), la acetil-CoA carboxilasa (ACC), que sintetiza malonil-CoA y una enzima málica dependiente de NADP⁺, que genera NADPH. Estos tres compuestos, acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH, son los sustratos empleados por FASN.³

La biosíntesis de ácidos grasos⁴ requiere una sucesión de reacciones enzimáticas coordinadas y se caracteriza por la extensión secuencial cíclica de la cadena alquílica, mediante una serie de condensaciones descarboxilativas que pueden resumirse en la ecuación representada en la Figura 1B.

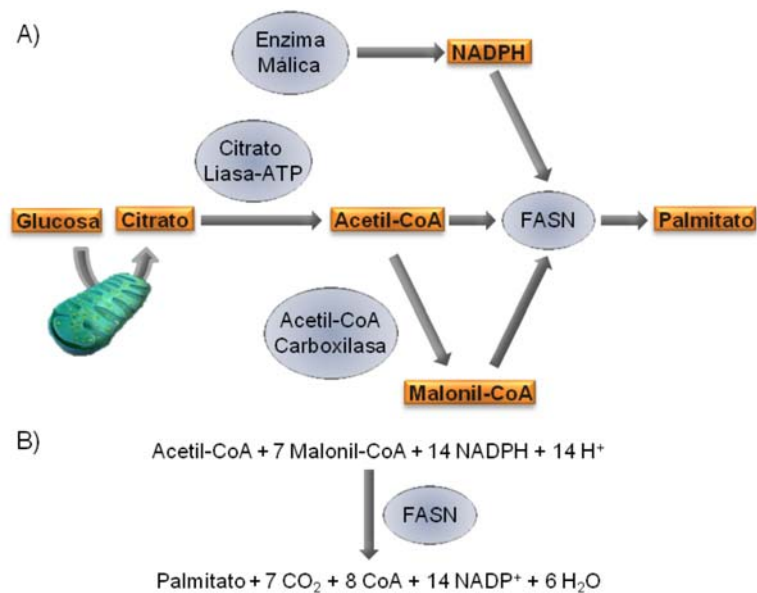


Figura 1. A) Representación esquemática de la síntesis de ácidos grasos, en la que se indican las principales enzimas involucradas: citrato liasa-ATP, acetil-CoA carboxilasa, enzima málica y sintasa de ácidos grasos (FASN). B) Ecuación que resume la actividad catalítica de la enzima FASN.

Para poder llevar a cabo estas reacciones, en organismos inferiores, como la mayor parte de las bacterias, y en las plantas, la síntesis de ácidos grasos está catalizada por un sistema enzimático constituido por enzimas independientes o asociadas, a las que en conjunto se denomina FASN tipo II.⁵ Por otro lado, en células eucariotas estas múltiples funciones se han unificado en una proteína multifuncional llamada FASN tipo I.⁶

La enzima FASN tipo I es estructuralmente distinta en función del organismo de que se trate. En los hongos, la enzima FASN tipo I es un dodecámero $\alpha_6\beta_6$ de 2.6 MDa, en la cual los dominios catalíticos están distribuidos en dos subunidades diferentes.⁷ En animales, es una enzima de localización citosólica y se trata de un homodímero del tipo α_2 donde cada monómero está constituido por un único polipéptido de 270 kDa. A su vez, cada monómero está formado por un dominio conocido como proteína transportadora de acilos (ACP) y seis dominios catalíticos diferentes. Así, los tres dominios catalíticos situados en el extremo N-terminal: β -cetoacilsintasa (KS), malonil/acetiltransferasa (MAT) y deshidratasa (DH) están separados por una región central flexible de unos 600 residuos de los cuatro dominios catalíticos del extremo C-terminal: enoilreductasa (ER), β -cetoacilreductasa (KR), ACP y tioesterasa (TE).^{8,9}

La obtención de la estructura cristalina de rayos X de la enzima FASN de mamíferos a resolución media (4.5 Å) indica que la enzima adopta una conformación en X con dos cámaras de reacción en cada lado, compuestas por todos los dominios catalíticos necesarios para llevar a cabo la reacción. Este estudio ha establecido la estructura secundaria de gran parte de la molécula, permitiendo ubicar casi todos los dominios catalíticos en el mapa de densidad electrónica. Sin embargo, la moderada resolución del modelo no ha posibilitado determinar de forma inequívoca la estructura de la zona de unión entre los dominios, ni los dominios ACP y TE debido a su inherente flexibilidad (Figura 2).¹⁰

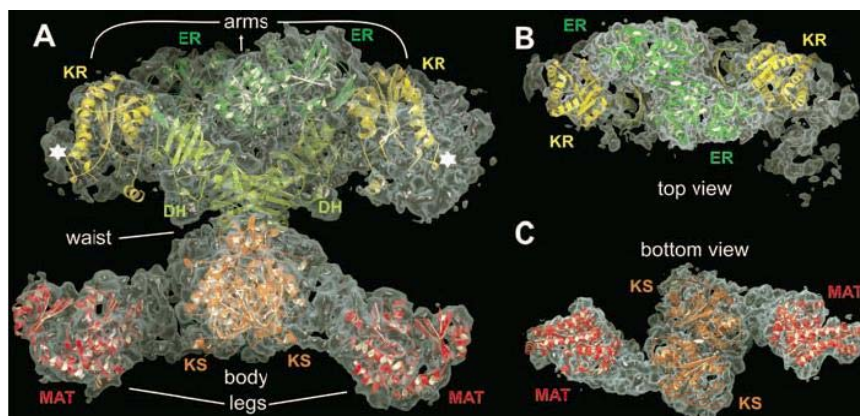


Figura 2. Estructura de rayos X (4.5 Å) de la enzima FASN de mamíferos.

La actividad catalítica de FASN se inicia con la unión de los sustratos acetilo y malonilo al dominio ACP, reacciones catalizadas por MAT. A continuación, el resto acetilo unido al ACP se transfiere a una cisteína presente en el dominio catalítico KS y reacciona con el malonil-ACP para formar el acetoacetil-ACP a través de una reacción tipo Claisen. Esta condensación va unida a una descarboxilación energéticamente favorable, ya que el dióxido de carbono desprendido es reciclado y utilizado por la enzima ACC en forma de bicarbonato para la formación de malonil-CoA. El producto de condensación es entonces reducido hasta la forma hidrocarbonada saturada por acción secuencial de los dominios con función reductasa y deshidratasa (KR, DH, ER). El butiril-ACP así formado se transfiere a la cisteína catalítica del dominio KS y se condensa con una nueva unidad de malonil-ACP y tiene lugar un segundo ciclo de reacciones de condensación y reducción del carbono en posición β . Tras cinco ciclos catalíticos análogos se completa una unidad alquílica de dieciséis átomos de carbono unida al ACP, que se hidroliza a palmitato libre por medio de la acción del dominio TE.¹¹

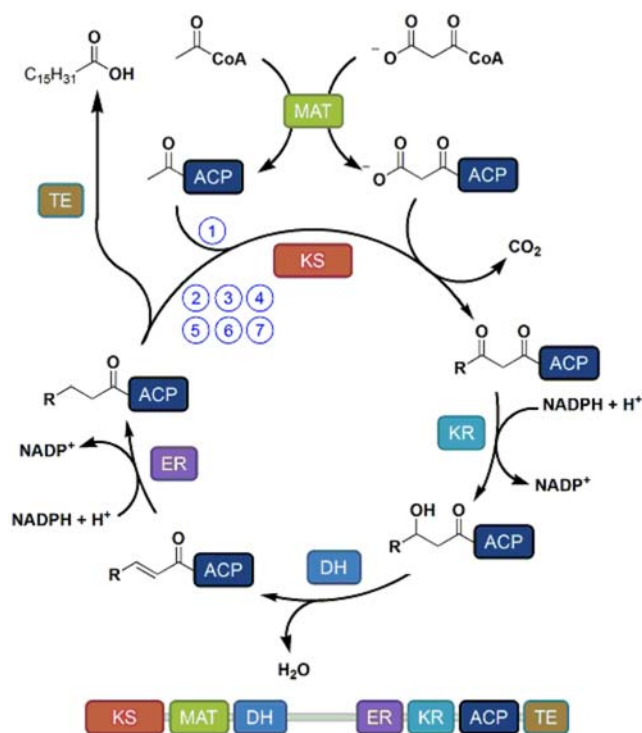


Figura 3. Esquema de la biosíntesis de ácidos grasos catalizada por FASN. Los dominios de la proteína son: β-cetoacilsintasa (KS), malonil/acetiltransferasa (MAT) y deshidratasa (DH), enolreductasa (ER), β-cetoacilreductasa (KR), ACP y tioesterasa (TE).

Aunque el producto principal de la acción enzimática de FASN es el palmitato (16:0), también se pueden producir otros ácidos grasos bien de cadena más larga como es el estearato (18:0), o de cadena más corta, como por ejemplo es el miristato (14:0), ácido graso producido por FASN en la glándula mamaria y segregado con la leche materna.¹²

El metabolismo de los ácidos grasos se encuentra estrictamente controlado, de modo que tanto su síntesis como su degradación obedezcan fielmente a las necesidades fisiológicas. En adultos sanos, FASN se encuentra expresada en células sensibles a hormonas, como son las de mama, próstata y endometrio, y en células con un elevado metabolismo lipídico, como por ejemplo son las presentes en el hígado y el tejido adiposo.¹³ La expresión de FASN en estos tejidos está regulada principalmente a nivel nutricional y hormonal de tal forma que bajo una alimentación correcta, las células usan preferentemente los ácidos grasos que provienen de la dieta, siendo por lo tanto la síntesis *de novo* de ácidos grasos innecesaria, lo que conlleva una baja expresión de la enzima FASN.¹³

1.2. FASN como diana terapéutica en cáncer.

Las células tumorales poseen un fenotipo metabólico muy diferenciado al de las células normales.¹⁴ Una de las primeras evidencias encontradas en este sentido fue el denominado efecto Warburg,¹⁵ el cual hace referencia al aumento significativo en la producción de lactato a partir de glucosa por medio de una glicólisis aeróbica. De esta forma, las células tumorales dependen de esta glicólisis para obtener la energía necesaria para su rápido desarrollo mientras que en las células normales la forma de obtener energía es por medio de la ruta de la fosforilación oxidativa. Así, un aumento en el metabolismo de glucosa es característico de un fenotipo asociado a cáncer.¹⁶

Otra gran diferencia en el metabolismo de las células tumorales es el aumento de la síntesis de lípidos usando glucosa como fuente de carbono. En este sentido, una elevada expresión de FASN está asociada a las variedades más agresivas de cáncer de mama, próstata, colon, endometrio, vejiga, hígado, piel, esófago, lengua, pulmón y ovario.¹⁷ Asimismo, la expresión de FASN en una lesión premaligna indica el riesgo de desarrollar un tipo de cáncer más agresivo, lo cual proporciona un modo de identificación temprana del proceso tumoral, favoreciendo estrategias terapéuticas tanto preventivas como en los primeros estadios de la enfermedad.¹⁸ Además, tanto la sobreexpresión de FASN como el consiguiente aumento de los niveles de palmitato reducen la sensibilidad de las células tumorales a los tratamientos de quimioterapia, mientras que la inhibición de la expresión de la enzima aumenta el efecto de los fármacos citotóxicos, lo que sugiere el uso de inhibidores de FASN como agentes sensibilizadores a tratamientos de quimioterapia. Teniendo en cuentas estas consideraciones, la determinación de los niveles de FASN aporta una relevante información tanto para el diagnóstico como para el pronóstico de la enfermedad.¹⁹

En el cáncer de mama en particular, la sobreexpresión de FASN está asociada a un factor de riesgo de muerte cuatro veces mayor, o incluso nueve veces mayor en los casos en que dicha sobreexpresión coincida con un elevado índice de proliferación (>17%).²⁰ Asimismo, al establecerse el valor pronóstico de la expresión de FASN, se determinó que ésta es un factor predictivo de recurrencia en los pacientes con cáncer de mama en estadio I.²¹ También se ha observado la correlación existente entre una elevada expresión de FASN y la agresividad del tumor.²² Así, se desarrolló un ensayo ELISA (enzimoinmunoensayo, *enzyme linked immunosorbent assay*) para la determinación cuantitativa de los niveles de FASN en sueros de pacientes con cáncer de mama.²³ Por tanto, la expresión de FASN juega un papel muy importante durante el desarrollo y el crecimiento del

cáncer de mama, y su inhibición resulta de utilidad en el tratamiento de esta enfermedad.²⁴ Por otro lado, la combinación de inhibidores de FASN con otros fármacos antitumorales aprobados para su uso clínico puede incrementar la eficacia de la quimioterapia.²⁵

En condiciones fisiológicas normales cualquier aumento en los niveles de expresión de FASN está estrictamente regulado a nivel nutricional y hormonal. Los factores nutricionales no pueden justificar la sobreexpresión de FASN encontrada en los diversos tipos de cáncer, por lo que la expresión de FASN debe estar regulada a nivel de amplificación del gen, transcripcional y post-traducciona. En lo que respecta al incremento en el número de copias, se ha podido detectar una elevada amplificación del gen de FASN en diferentes tipos de cáncer de próstata, de tal forma que un aumento en la amplificación del gen puede contribuir parcialmente a la elevada expresión de FASN encontrada.¹⁹

La regulación a nivel transcripcional representa la mayor contribución a la sobreexpresión de FASN en células tumorales, siendo los factores de crecimiento, las hormonas y sus receptores los principales responsables de dicha sobreexpresión (Figura 4A). Así, el factor de crecimiento epidérmico (*epidermic growth factor*, EGF) estimula la expresión de FASN por medio de sus receptores ERBB1 y ERBB2 (también llamados HER1 y HER2, respectivamente). En cáncer de mama y de próstata, en los que las células tumorales poseen elevados niveles de receptores hormonales, la expresión de FASN aumenta después de un tratamiento hormonal debido al incremento en la transcripción de su gen. Los efectos producidos por las hormonas, sus factores de crecimiento y sus receptores sobre la expresión de FASN son complicados ya que suponen la activación e interacción entre diferentes rutas de transducción de señales. En este sentido, la activación de las vías de transducción de señales mediadas por las enzimas fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) estimulan la expresión de FASN a través del factor de transcripción denominado proteína de unión a elementos esteroideos 1c (*sterol regulatory element-binding protein 1c*, SREBP-1c), la cual también se encuentra sobreexpresada en células tumorales. Por último, la regulación a nivel post-traducciona puede contribuir a la sobreexpresión de FASN en células tumorales. Así, en células de cáncer de próstata, se ha demostrado que FASN interactúa con la proteasa específica de ubiquitina (USP2a), la cual rompe la unión entre FASN y la ubiquitina lo que evita la degradación de la enzima FASN por parte del proteasoma (Figura 4B).²⁶

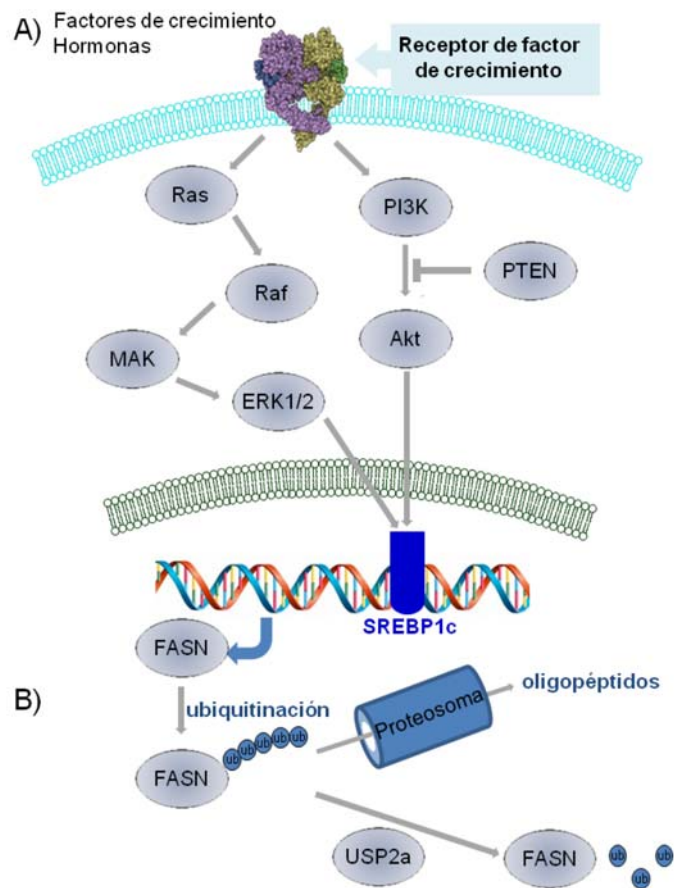


Figura 4. Principales mecanismos en la sobreexpresión de FASN. A) La sobreexpresión de los factores de crecimiento y de sus receptores produce un aumento descontrolado de los niveles de FASN. B) La acción de USP2a sobre la enzima FASN ubiquitinada evita la su degradación por medio del proteasoma.

En términos fisiológicos, la sobreexpresión de FASN encontrada en los diferentes tipos celulares de cáncer produce un aumento de los niveles de lípidos necesarios para la división celular, la biosíntesis de lípidos de membranas y de lípidos involucrados en rutas de transducción de señales indispensables para la proliferación celular.²⁷ También se ha propuesto que durante los primeros estadios del desarrollo del tumor en los cuales la angiogénesis no se ha producido lo suficiente como para proporcionar los nutrientes y el oxígeno necesario, las células tumorales contienen grandes niveles de poder reductor (en forma de NADH^+ y NADPH^+) por lo que un aumento en la actividad enzimática de FASN

consume este poder reductor lo que ayuda a las células tumorales a superar las condiciones iniciales de hipoxia.²⁶

1.3. Inhibidores de FASN.

De lo expuesto anteriormente resulta evidente que FASN constituye una novedosa y prometedora diana terapéutica para el tratamiento del cáncer que necesita ser validada, por lo que el desarrollo de compuestos capaces de inhibir la acción de esta enzima ha generado un enorme interés en el campo de la química médica.^{28,29} De hecho, la inhibición de FASN produce efectos citotóxicos en células tumorales, efecto para el que se postulan diferentes causas:²⁶

a) Algunos tipos de células tumorales parecen adquirir una elevada dependencia de la síntesis *de novo* de ácidos grasos para la formación de membranas. Así, los efectos citotóxicos observados pueden justificarse mediante la falta de fosfatidilcolina, cuyos niveles en el interior de la célula son muy sensibles a la actividad de FASN. Este mecanismo se pudo confirmar al observar un efecto citotóxico similar al inhibir la enzima quinasa de colina.

b) Modificación de las funciones de la membrana lipídica. Una de las principales funciones de FASN en tumores es la producción de fosfolípidos que intervienen en la formación de microdominios de membrana resistentes a detergentes denominados *lipid rafts*. Así, al inhibir la enzima FASN se producen cambios en la formación de dichos microdominios de membrana lo que produce tanto una incorrecta localización como una pérdida de funcionalidad de los receptores de tirosina quinasa EGFR y HER2, ambos involucrados en las vías de transducción de señales que promueven la proliferación celular.

c) Inhibición de la replicación del ADN. Por otra parte, la biosíntesis de fosfolípidos es mayor durante las fases celulares G₁ y S, preparándose así la célula para la división. La inhibición de FASN produce una parada muy potente de la replicación de ADN, lo que detiene por tanto el ciclo celular antes de la fase G₁.

d) Estrés metabólico no genotóxico regulado por p53. El estado de p53 es determinante para la toma de la decisión entre la apoptosis y la parada de crecimiento después de inhibir a FASN. Así, los inhibidores de FASN inician de forma más efectiva la apoptosis de células con p53 no funcional, mientras que aquellas células en las que la función de p53 se encuentra intacta tienden a mostrar efectos citostáticos.

e) Acumulación tóxica de malonil-CoA. La inhibición de FASN produce una acumulación de su sustrato malonil-CoA. Éste es un inhibidor de CPT-1, lo que produce un descenso en la β -oxidación de ácidos grasos y un aumento en los niveles de ceramida en el interior de la célula. Esto desencadena la expresión de los genes involucrados en la vía de apoptosis mediada por ceramida (BNIP3, TRAIL y DAPK2).

f) Inhibición de proteínas anti-apoptóticas. La inhibición de FASN produce un descenso en los niveles de la proteína quinasa B (AKT), lo cual precede a la inducción de la apoptosis de las células tumorales, lo que sugiere un posible mecanismo para la muerte celular provocada por la inhibición de FASN.

Con el fin de inducir y estudiar los efectos antitumorales anteriormente descritos, durante los últimos años se han desarrollado varios tipos de inhibidores de FASN pertenecientes a clases estructurales diferentes y con distintos mecanismos de acción.

1.3.1. El inhibidor natural cerulenina.

Cerulenina ((2*R*,3*S*)-3-[(4*E*,7*E*)-nona-4,7-dienoil]oxirano-2-carboxamida) es un compuesto natural producido por el hongo *Cephalosporium ceruleus*. Aunque en un principio se estudió su uso como antibiótico, se pudo observar que también es capaz de inhibir la enzima FASN con un valor de CI_{50} de 4.6 μ M.^{30,31} Mecanísticamente, ejerce su efecto inhibitorio al unirse de forma covalente a la cisteína del centro catalítico del dominio KS.³² La estructura del aducto cerulenina-cisteína, aislado por digestión enzimática del complejo FASN-cerulenina, se ha podido establecer por medio de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS), identificándose la forma activa de la cerulenina como una hidroxí- γ -butirolactama cuyo centro electrófilo es el carbono α de la lactama (Figura 5).³³

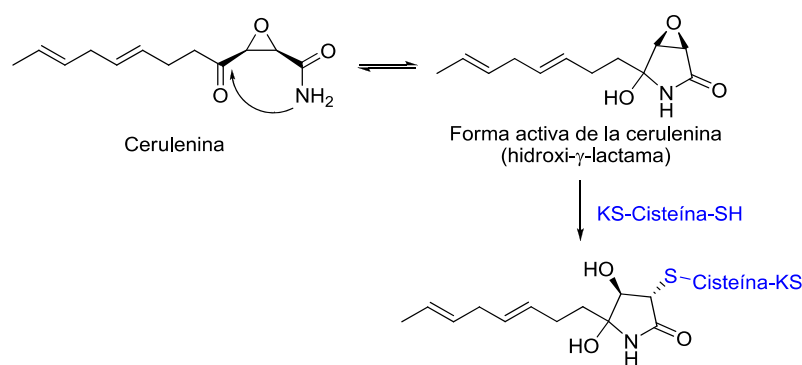


Figura 5. Estructura del inhibidor natural cerulenina y su mecanismo de unión al dominio KS de la enzima FASN.

Cerulenina ha demostrado capacidad de inhibir la proliferación de diferentes tipos de células tumorales produciendo la apoptosis de las mismas.^{32,34,35} Sin embargo, la presencia de un grupo epóxido en su estructura, químicamente muy reactivo, hace a cerulenina susceptible de otros ataques no selectivos que limitan su posible aplicación terapéutica.³⁶

1.3.2. El inhibidor sintético C75 y derivados.

Intentando solventar las desventajas asociadas al uso de cerulenina, se han desarrollado compuestos con el objetivo de mimetizar su estructura pero eliminando el grupo epóxido. En esta nueva familia de α -metileno- γ -butirolactonas, el compuesto denominado C75 (ácido (2R,3S)-4-metileno-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-carboxílico) ha perdido el grupo epóxido presente en cerulenina, lo que le hace más estable y específico en términos de su reactividad química.³⁷ Esta nueva familia de inhibidores sintéticos se diseñó teniendo en cuenta la condensación de Claisen que tiene lugar entre el anión enolato proveniente de acetil-ACP y el resto malonilo que está unido a la cisteína del centro catalítico del dominio KS. Así, el compuesto C75 puede actuar como aceptor de Michael, reaccionando con el anión enolato unido al ACP generado en el dominio KS (Figura 6),³⁸ e inhibiendo FASN ($CI_{50} = 15 \mu M$). Este mecanismo de acción se apoya en estudios cinéticos en los que se observó una unión covalente irreversible con la enzima FASN de mamíferos.³⁷ Asimismo, el derivado C273, análogo a C75 pero en el que el doble enlace exocíclico se ha reducido, no inhibe FASN, lo que confirma este mecanismo de inhibición como el principal.³⁹ No obstante, estudios adicionales sugieren un mecanismo de acción complejo ya que C75 también interacciona con los dominios ER y TE de FASN.⁴⁰

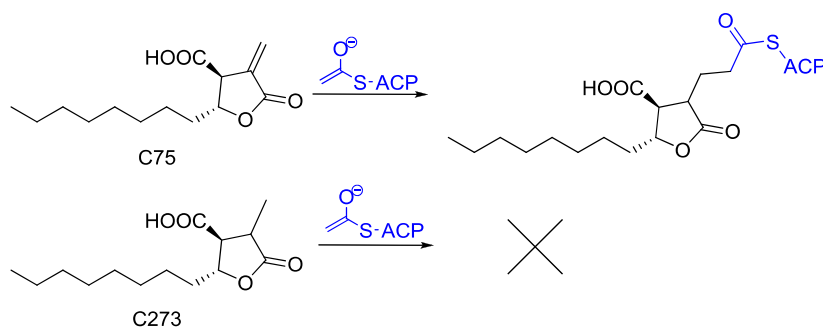


Figura 6. Mecanismo de inhibición de FASN de los inhibidores sintéticos C75 y C273.

Progresivamente, diversos estudios han confirmado su importante actividad antitumoral en diferentes líneas celulares.⁴¹ Además, estudios *in vivo* con ratones transgénicos demostraron que la inhibición de FASN es quimiopreventiva en el desarrollo del cáncer de mama.⁴² Sin embargo, a pesar de los prometedores resultados de C75 como agente antitumoral, pronto se descubrió que su administración producía una elevada pérdida de peso en ratones. Esto es debido a que este compuesto ejerce una acción dual: por una parte, en el hipotálamo la inhibición de FASN produce elevados niveles de malonil-CoA que constituyen una señal de saciedad, provocando por tanto una disminución del apetito. Además, periféricamente, en órganos como el hígado y el tejido adiposo, C75 actúa como un activador de la enzima carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-1), produciendo un desmesurado incremento en el proceso de β -oxidación de ácidos grasos, lo que induce una elevada pérdida de peso.⁴³

Con el fin de mejorar las propiedades terapéuticas del inhibidor C75 se desarrollaron diferentes series de compuestos entre los que destacan los análogos con estructura de tiolactona con una mayor capacidad para inhibir FASN (Figura 7A, $CI_{50} = 2.5 \mu M$ y Figura 7B, $CI_{50} = 0.79 \mu M$). Ambos compuestos se unen de manera similar a C75 en el dominio KS. Además estos compuestos muestran citotoxicidad en células tumorales de cuello uterino. Aunque estos compuestos mejoran sensiblemente la potencia en la inhibición de FASN, todavía está por determinar el efecto que ejercen sobre CPT-1.⁴⁴

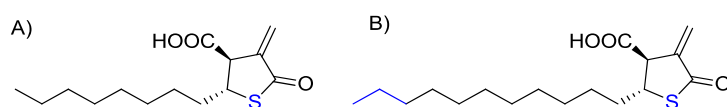
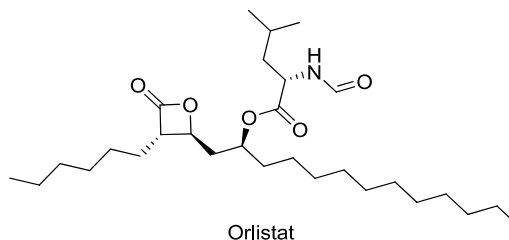


Figura 7. Inhibidores de FASN con estructura de tiolactona.

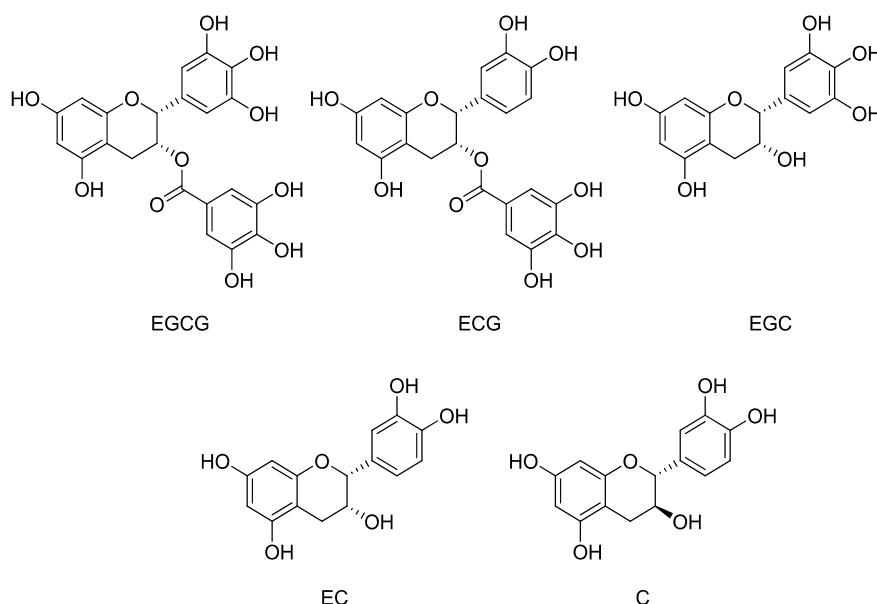
Por último, dentro de la familia de las lactonas, orlistat (*N*-formil-L-leucinato de (1*S*)-1-[[[(2*S*,3*S*)-3-hexil-4-oxooxetan-2-il]metil]dodecilo), fármaco aprobado por el organismo norteamericano para el control de los fármacos y productos alimenticios (FDA, *food and drug administration*) para el tratamiento de la obesidad, es un inhibidor de la lipasa pancreática y de la lipasa gástrica. También actúa como inhibidor de FASN ($CI_{50} = 1.35 \mu M$), siendo su mecanismo de inhibición irreversible, al acilar la serina presente en el centro catalítico del dominio TE por medio de la apertura de la β -lactona.⁴⁵ Aunque orlistat ha mostrado tanto citotoxicidad frente a diferentes líneas celulares como eficacia antitumoral en modelos animales, su uso como agente quimioterapéutico aún se está estudiando.⁴⁶



1.3.3. El inhibidor natural EGCG.

El té, y en concreto el té verde, es una de las infusiones más consumidas en todo el mundo, ya que además de cafeína contiene una gran cantidad de principios activos que resultan muy beneficiosos para la salud. Así, uno de los efectos positivos que se le atribuye al consumo de té es un posible potencial antitumoral.⁴⁷ En la década de los noventa ya se pudo demostrar la acción inhibitoria del té sobre la carcinogénesis en modelos animales de cáncer de pulmón, piel, esófago, hígado y estómago, y estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto las propiedades quimiopreventivas del té verde.⁴⁸

Estos beneficiosos efectos del té verde se atribuyen a sus flavonoles, llamados también polifenoles del té, que están presentes en cantidades desde un 1% hasta un 13%. Así entre los flavonoles mayoritarios cabe destacar el (-)-3-galato de epigallocatequina (EGCG, 9-13%), el (-)-3-galato de epicatequina (ECG, 3-6%), la (-)-epigallocatequina (EGC, 3-6%), la (-)-epicatequina (EC, 1.3%) y, en una proporción menor, la (+)-catequina (C, 1%).⁴⁹



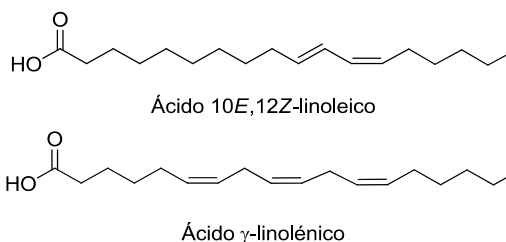
En concreto, EGCG, que es el polifenol que se encuentra en mayor proporción, es un inhibidor de FASN que induce apoptosis y detiene el ciclo celular de células tumorales.⁵⁰ El mecanismo de inhibición de EGCG es diferente al de cerulenina, ya que el efecto de la inhibición ha sido asociado a la interacción con el dominio KR de FASN. La cinética de la inhibición muestra que en los primeros minutos la inhibición es muy rápida, produciéndose una interacción rápida y reversible entre EGCG y el sitio de unión de NADPH en el dominio KR, que se transforma posteriormente en una unión irreversible entre EGCG y algún aminoácido esencial del dominio KR que aún no se ha podido determinar.⁵¹ Asimismo, se han llevado a cabo estudios de relación estructura-actividad de los polifenoles del té, en los que se demostró que la presencia del grupo galoilo es fundamental para su actividad inhibitoria de FASN.⁵²

En conjunto, todos los resultados descritos hasta la actualidad indican que EGCG presenta todos los efectos celulares, funcionales y moleculares de inhibición tumoral de C75, pero no tiene ningún efecto sobre la actividad de CPT-1.⁵³ Este dato apoya la hipótesis de que los inhibidores de FASN que se comporten como EGCG inducirán citotoxicidad pero no pérdida de peso in vivo. Sin embargo, la eficacia de EGCG es limitada debido a su moderado valor de $CI_{50} = 52 \mu M$,⁵² y a que presenta una biodisponibilidad muy baja, con valores de absorción de en torno al 0.012% de la cantidad administrada por vía oral,⁵⁴ lo que

puede deberse a la baja estabilidad de EGCG en soluciones neutras o alcalinas, condiciones que se dan en el intestino y en los fluidos corporales.

1.3.4. Otros inhibidores de origen natural.

Los ácidos grasos poliinsaturados (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) constituyen una aproximación dietética en el tratamiento y prevención del cáncer todavía bajo discusión. En este sentido, se han identificado dos PUFAs como inhibidores de la enzima FASN. El ácido conjugado 10*E*,12*Z*-linoleico (ácido (10*E*,12*Z*)-octadeca-10,12-dienoico), isómero conjugado del ácido linoleico presente tanto en la carne como en la leche de los animales rumiantes, produce una disminución de la actividad enzimática (50% de inhibición de FASN a 100 μ M)⁵⁵ y de la expresión de FASN, y reduce el crecimiento de células tumorales de mama (MCF-7), colon (HT-29) y próstata (LNCaP). En el mismo sentido, el ácido γ -linolénico [ácido (6*Z*,9*Z*,12*Z*)-octadeca-6,9,12-trienoico], ácido graso esencial poliinsaturado ω -6, se ha identificado también como agente citotóxico en células de cáncer de mama. En un principio la citotoxicidad observada se justificó mediante la formación de radicales libres y peroxidación. Sin embargo, recientemente se ha podido demostrar que el propio ácido γ -linolénico sufre un proceso autooxidativo que conduce a la formación de los respectivos epóxidos de posición 9,10- ó 10,12- los cuales actúan directamente como inhibidores de FASN (41% de inhibición de FASN a 22.4 μ M).⁵⁶ Sin embargo, la eficacia de estos PUFAs es limitada debido nuevamente a su moderado valor de CI_{50} .



1.3.5. Otros inhibidores sintéticos.

Además de los inhibidores anteriormente descritos, en los últimos años se han identificado algunos inhibidores de FASN estructuralmente distintos. Éstos se han caracterizado fundamentalmente empleando metodologías de cribado de alta productividad (*high throughput screening*, HTS) o de diseño asistido por ordenador. Así, mediante HTS se ha identificado una nueva clase estructural de inhibidores de FASN basados en la estructura de pirimidina-2,4,6-triona. Dentro de

esta serie, el mejor compuesto (Figura 8A) inhibe un 60% la actividad enzimática de FASN a una concentración de 5 μM y es citotóxico en la línea de cáncer de mama MDA-MB-435 ($\text{CI}_{50} = 3.5 \mu\text{M}$).⁵⁷ En el transcurso de otro HTS se identificó 4-hidroxi-6-nitro-3-fenilquinolin-2(1*H*)-ona como inhibidor de FASN que mediante un posterior proceso de optimización condujo a la identificación de compuestos con una elevada potencia (Figura 8B, $\text{CI}_{50} = 19 \text{ nM}$).⁵⁸ Mediante el diseño asistido por ordenador se ha podido identificar una nueva clase de inhibidores derivados de 1,3-tiazolhidrazonas. El derivado más potente de estos compuestos inhibe de forma competitiva el dominio KS de FASN (Figura 8C, $\text{CI}_{50} = 13 \mu\text{M}$), siendo además capaz de inhibir la proliferación celular de diferentes líneas tumorales.⁵⁹

Por otro lado, triclosán (Figura 8D), antibiótico de amplio espectro y de uso muy general, además de inhibir la acción de las enzimas con actividad enoil-reductasa en bacterias, es también capaz de bloquear el dominio ER de la enzima FASN de mamíferos con valores de CI_{50} comprendidos entre 10 μM y 20 μM dependiendo de las condiciones del ensayo y presenta actividad citotóxica en cultivos celulares de cáncer de mama (SK-Br3 y MCF-7).⁶⁰

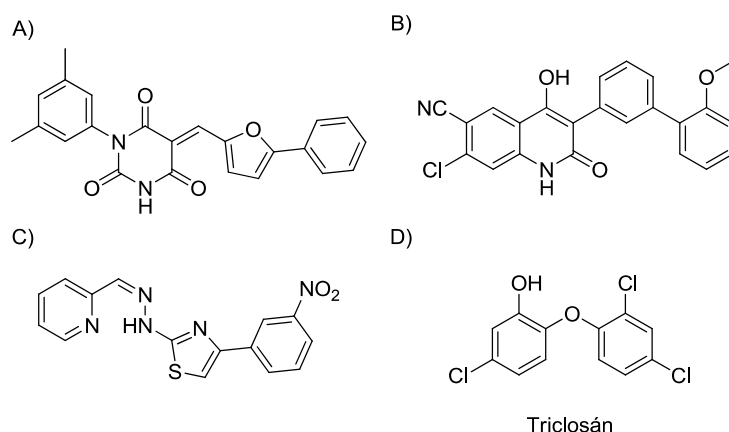


Figura 8. Otros inhibidores sintéticos de FASN.

En conjunto, todos estos datos ponen de manifiesto el interés en el desarrollo de nuevos inhibidores de la enzima FASN los cuales pueden representar una nueva aproximación terapéutica en el tratamiento del cáncer.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

La enzima FASN se ha propuesto recientemente como una posible diana terapéutica para el tratamiento del cáncer de mama. Fisiológicamente, su función principal es la biosíntesis de ácidos grasos. En condiciones normales y en presencia de una dieta equilibrada, en la cual los ácidos grasos esenciales son ingeridos, no se requiere una elevada biosíntesis de los mismos, y por tanto la actividad de FASN es secundaria. Sin embargo, la sobreexpresión y sobreactivación de FASN juega un papel muy importante durante el desarrollo y el crecimiento tumoral, por lo que su inhibición podría resultar de utilidad en el tratamiento de esta enfermedad. Por tanto, la validación de FASN como diana terapéutica está generando un enorme interés en el campo de la química médica. En este sentido, entre los escasos inhibidores de FASN con actividad antitumoral descritos destacan los productos naturales cerulenina (pág. 13) y EGCG (pág. 16), y el compuesto sintético C75 (pág. 14). Sin embargo, todos ellos presentan desventajas que impiden continuar con su desarrollo clínico, tales como elevada inestabilidad química, baja actividad biológica o interacción secundaria indeseada con otras enzimas.

Por tanto, el desarrollo de nuevos compuestos capaces de inhibir FASN podría abrir nuevos horizontes para el tratamiento del cáncer de mama, siendo éste el objetivo del presente trabajo de investigación. Basándonos en la estructura del polifenol natural EGCG se ha diseñado una serie de compuestos de fórmula general **I** (Figura 9) en la que el sistema de cromano se ha sustituido por distintas subunidades cíclicas (S. C.) a las cuales se unen polihidroxifenilos mediante diferentes espaciadores (X, Y).

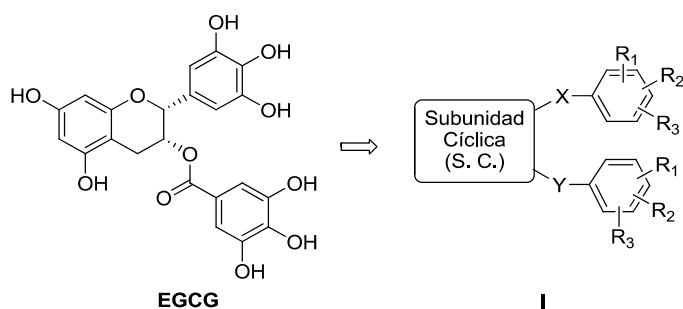


Figura 9. Estructura de los compuestos de fórmula **I** inspirada en el polifenol natural EGCG.

Este amplio objetivo conlleva las siguientes etapas:

1. Búsqueda de *hit(s)*.
2. Optimización del (los) *hit(s)*: proceso *hit to lead*.
3. Caracterización farmacológica del (los) *lead(s)*.
4. Estudio de la toxicidad y de las propiedades farmacocinéticas.
5. Determinación de la eficacia antitumoral.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Búsqueda de *hits*.

De acuerdo con los objetivos propuestos en el presente trabajo, se inició la búsqueda de nuevas estructuras polifenólicas inspiradas en el compuesto natural EGCG, pero estructuralmente más sencillas, más asequibles sintéticamente y con buenas propiedades farmacológicas. Así, como prueba de concepto, se diseñó una serie de compuestos **I** (**1-4**) caracterizados por la presencia de una subunidad cíclica (S. C.) alifática o aromática, sustituida con dos grupos galato (radical 3,4,5-trihidroxibenzoiloxi) y con valores de clogP comprendidos entre 2.2 y 3.7.

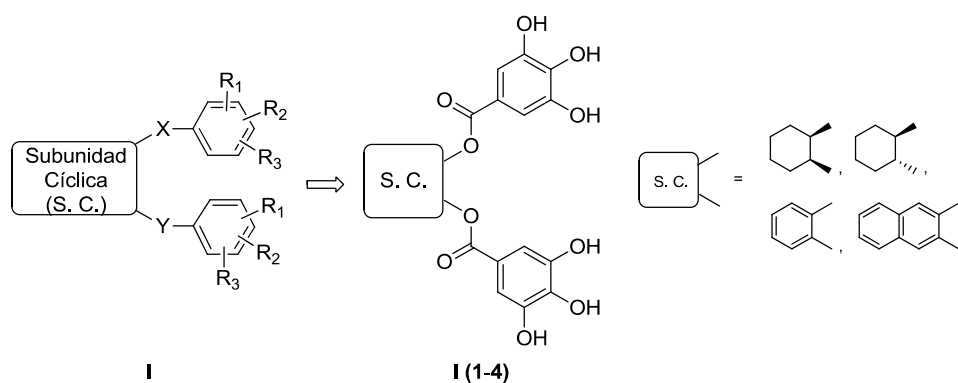
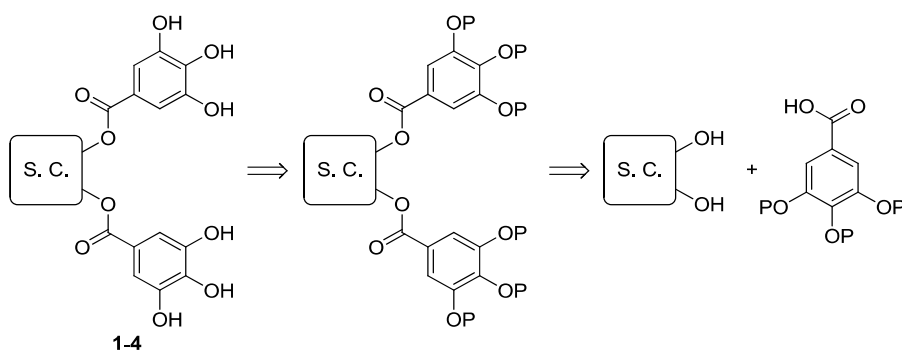


Figura 10. Búsqueda de *hits*: serie inicial de compuestos de estructura general **I**.

3.1.1. Síntesis de los compuestos **1-4**.

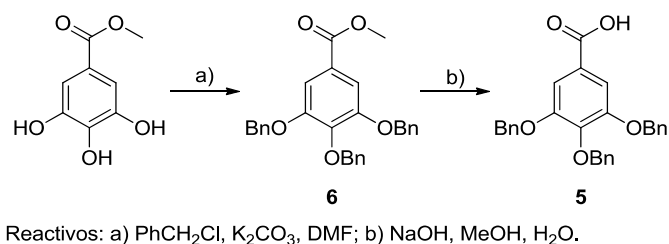
La síntesis de los ésteres **1-4** se planteó según la metodología general que se describe en el Esquema 1, consistente en la esterificación de los dioles

seleccionados con ácido gálico convenientemente protegido, seguido de la desprotección de los grupos fenólicos.



Esquema 1

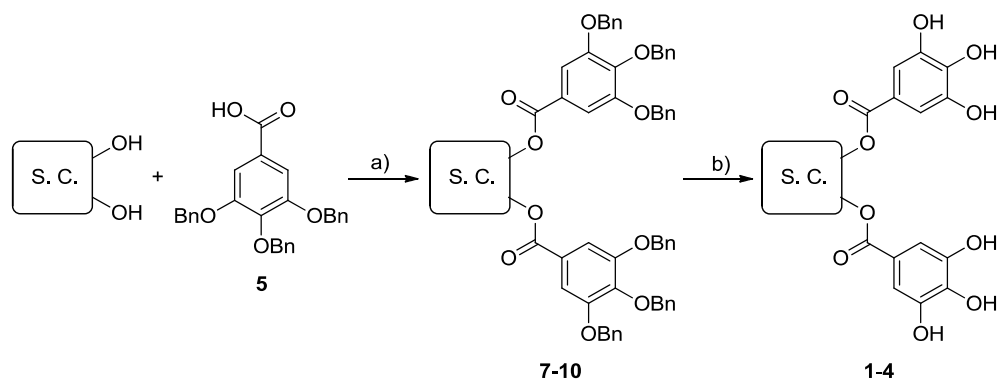
Como grupo protector de los hidroxilos fenólicos se eligió el grupo bencilo (Bn). Así, el ácido intermedio **5**⁶¹ se preparó mediante perbencilación de los grupos fenólicos del galato de metilo comercial y posterior hidrólisis del éster **6**. Los dos pasos transcurren con rendimientos cuantitativos y los compuestos se aíslan por filtración a vacío sin necesidad de ser purificados para su utilización en la reacción de condensación, lo que permite acumular grandes cantidades del ácido **5** en un corto espacio de tiempo.



Esquema 2

A continuación, los ésteres protegidos **7-10** se sintetizaron por reacción entre el ácido 3,4,5-tris(benciloxi)benzoico (**5**) y el diol comercial correspondiente utilizando *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) como agentes de condensación. Los intermedios bencilados se obtuvieron con rendimientos de aceptables a buenos (45-77%) tras su purificación cromatográfica en columna de gel de sílice. Por último, los compuestos finales **1-4** se prepararon mediante hidrogenación catalítica de sus respectivos precursores bencilados **7-10**,

la cual se puso a punto en cuanto a catalizadores y disolventes se refiere, obteniéndose los mejores resultados utilizando hidróxido de paladio sobre carbono en una mezcla de diclorometano (DCM) y etanol (Esquema 3). Cabe señalar que la elevada polaridad de los compuestos resultantes conlleva una dificultad añadida a su manipulación durante los procesos de aislamiento y purificación, lo que se traduce en los moderados rendimientos de la reacción de hidrogenación, oscilando éstos entre el 60% y el 88%.



1,7: S. C. = (\pm)-*trans*-1,2-ciclohexanodiilo

2,8: S. C. = *cis*-1,2-ciclohexanodiilo

3,9: S. C. = 1,2-fenileno

4,10: S. C. = 2,3-naftalenodiilo

Reactivos: a) DCC, DMAP, THF; b) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, EtOH, DCM.

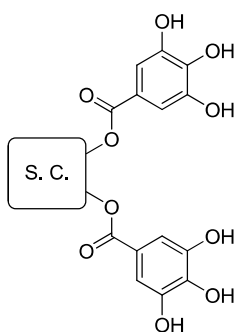
Esquema 3

3.1.2. Determinación de la capacidad para inhibir la proliferación de células tumorales y la actividad de FASN.

Una vez obtenida esta serie inicial de compuestos se estudió su capacidad para inhibir la proliferación celular de la línea de cáncer de mama SK-Br3, la cual expresa niveles elevados de FASN. La citotoxicidad celular se determinó mediante un ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Tras la incubación en presencia del compuesto objeto de estudio durante 48 h, las células que aún permanecen funcionales reducen el MTT generando un precipitado coloreado (formazán), el cual se cuantifica midiendo su absorbancia a 570 nm. La capacidad citotóxica de los compuestos se expresa a través del valor de su concentración inhibitoria 50 (CI_{50}).

Teniendo en cuenta los resultados recogidos en la Tabla 1, los compuestos sintetizados **3** y **4** presentaron una actividad citotóxica superior a la del compuesto de referencia EGCG. Para confirmar que la citotoxicidad observada está mediada por la inhibición directa de FASN, se estudió su efecto sobre esta enzima. La actividad de FASN se determinó en fracciones solubles provenientes de células SK-Br3 previamente incubadas durante 24 h en presencia de una concentración de compuesto igual al valor de CI_{50} obtenido en el ensayo de citotoxicidad anterior. La actividad de los compuestos se expresa como el porcentaje de inhibición con respecto a una muestra control (Tabla 1). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto una cierta relación entre la citotoxicidad observada y el grado de inhibición de FASN. Así, los compuestos con citotoxicidad moderada, tales como **3** ($CI_{50} = 125 \mu M$) y **4** ($CI_{50} = 76 \mu M$), inhiben FASN con baja potencia y los derivados **1** y **2**, que presentan una CI_{50} superior a $150 \mu M$, no ejercen ningún efecto sobre esta enzima.

Tabla 1. Valores de citotoxicidad e inhibición de FASN de los compuestos **1-4**



Comp.	S. C.	CI_{50} (μM) ^a	Inhibición de FASN (%) ^b	Comp.	S. C.	CI_{50} (μM) ^a	Inhibición de FASN (%) ^b
1		> 150	N.I. ^c	3		125 ± 5	21 ± 5
2		> 150	N.I.	4		76 ± 9	31 ± 5
Cerulenina		26 ± 5	$4.5 \mu M$ ^d	EGCG		149 ± 20	20 ± 3

^aLos valores de CI_{50} corresponden al valor medio y error estándar (E.E.) obtenidos en un mínimo de dos experimentos independientes realizados por triplicado. ^bLos valores de inhibición de FASN fueron determinados a una concentración igual al valor de CI_{50} obtenido para la inhibición de la proliferación de células SK-Br3 y corresponden al valor medio y E.E. de un mínimo de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

^cN.I. Inhibición no significativa de la actividad enzimática de FASN a la concentración ensayada. ^dValor de CI_{50} de inhibición de FASN para la cerulenina; véase ref. 31.

Una vez identificados los *hits* **3** y **4** como nuevos inhibidores de la enzima FASN con actividad citotóxica, se procedió a la optimización de los elementos estructurales en los compuestos de fórmula **I** (Figura 10): la subunidad cíclica (S. C.), el espaciador (X, Y), y el número y posición de los grupos hidroxilo (R_1 - R_3).

3.2. Optimización de los *hits*. Proceso *hit to lead*.

En el proceso *hit to lead*, como primer paso se planteó la modificación de la subunidad cíclica (S. C.) manteniendo las unidades de galato en la estructura general **I** (Figura 11). Para la síntesis de los nuevos ésteres se puso a punto una metodología sintética basada en el uso de reactivos soportados, con el fin de disminuir el número de etapas de purificación cromatográfica.

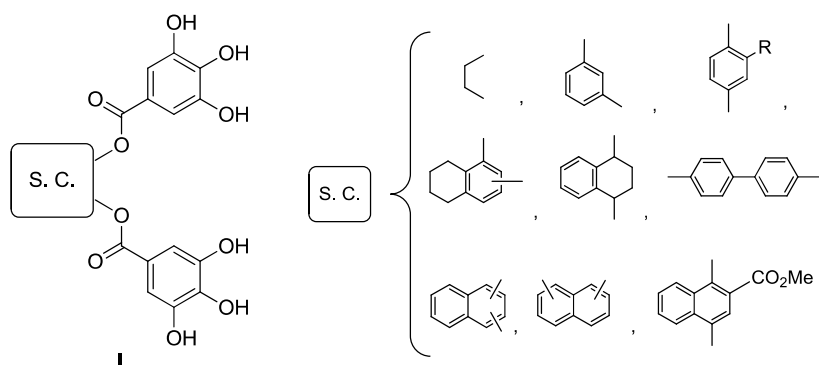


Figura 11. Proceso *hit to lead*: modificaciones en la subunidad cíclica (S. C.).

3.2.1. Optimización de la reacción de esterificación mediante la aplicación de reactivos soportados.

Los reactivos soportados son polímeros funcionalizados diseñados para llevar a cabo transformaciones sintéticas que mimetizan a la de sus equivalentes en disolución. El uso de reactivos soportados permite simplificar en gran medida la purificación del producto de la reacción permitiendo el aislamiento del mismo mediante una sencilla etapa de filtración (Figura 12).

Se conocen diferentes tipos de reactivos soportados sobre polímeros para llevar a cabo reacciones de esterificación (Figura 13).^{62,63} En primer lugar se seleccionaron como sustratos modelo para optimizar la reacción el ácido gálico protegido **11** y el 1,3-dihidroxibenceno (resorcinol). El ácido protegido **11** se preparó por tratamiento del ácido gálico comercial con cloruro de *terc*-

butildimetilsililo (TBS) seguido de hidrólisis selectiva *in situ* del éster de silicio intermedio (Esquema 4).⁶⁴

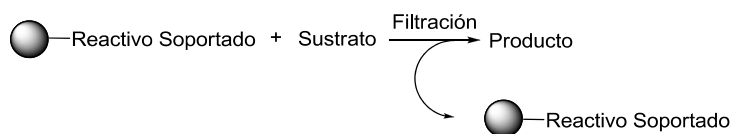


Figura 12. Esquema general de uso de reactivos soportados.

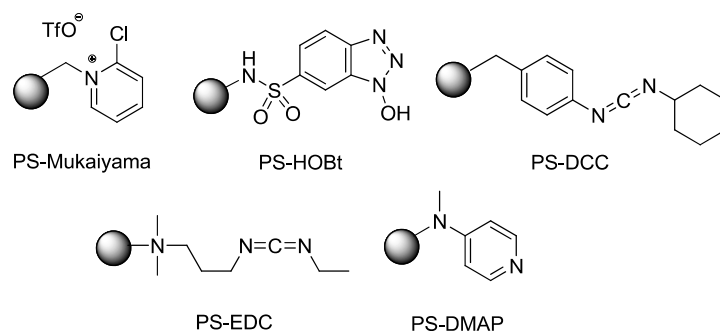
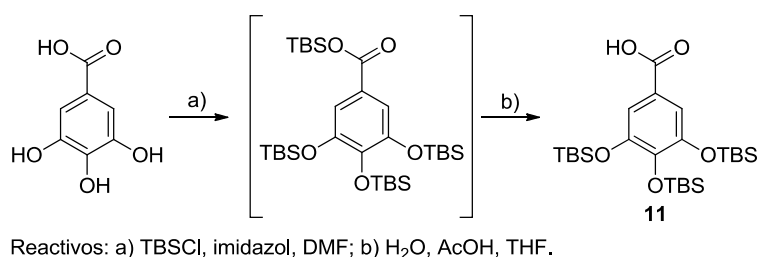


Figura 13. Reactivos soportados sobre polímeros habitualmente usados para reacciones de esterificación.



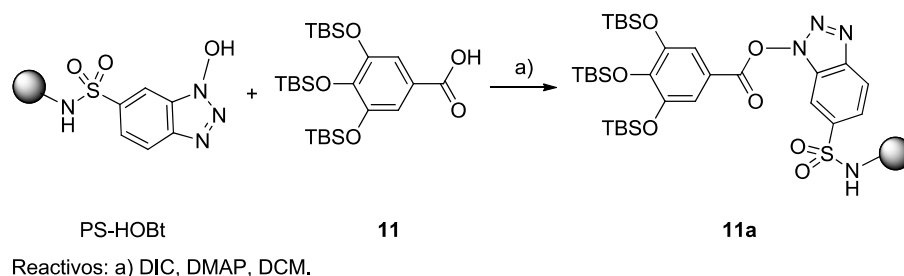
Esquema 4

En cuanto a la selección del diol, los ciclohexanodiolos fueron descartados para ser usados en la reacción modelo de esterificación debido a que la mayor parte de los productos diseñados contienen una subunidad cíclica de naturaleza aromática. Los naftalenodiolos también fueron descartados ya que antes de ser utilizados deben ser purificados (sobre todo en el caso del 1,3- y el 1,4-naftalenodiol). Por último, de entre los dihidroxibencenos, la hidroquinona no se consideró debido a que en ensayos preliminares se pudo observar su oxidación a la quinona produciendo a su vez una mezcla compleja de productos. Entre el

catecol (1,2-dihidroxibenceno) y el resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) se seleccionó este último ya que es el que presenta el menor impedimento estérico.

Así, se llevó a cabo la reacción de esterificación entre el ácido **11** y el resorcinol en presencia de distintos agentes de acoplamiento soportados (Figura 13) con el fin de identificar el reactivo adecuado. El empleo del reactivo de Mukaiyama soportado sobre poliestireno (PS-Mukaiyama) dio lugar a mezclas de productos de esterificación junto con el anhídrido del ácido, por lo cual se descartó su uso. En el caso de las carbodiimidas PS-DCC y PS-EDC no se observó reacción del ácido con la resina, por lo que no tiene lugar su activación y no se produce la reacción con el diol. Con el equivalente soportado de la DMAP (PS-DMAP) sí se obtiene el derivado activado del ácido pero éste no reacciona con el diol, por lo que en nuestro caso no puede ser usado como reactivo de acoplamiento. Únicamente el 1-hidroxibenzotriazol soportado sobre poliestireno (PS-HOBt) permitió acceder al producto de esterificación deseado, por lo que fue seleccionado para optimizar las condiciones de reacción que permitieran acceder selectivamente al mono- o diéster correspondiente.

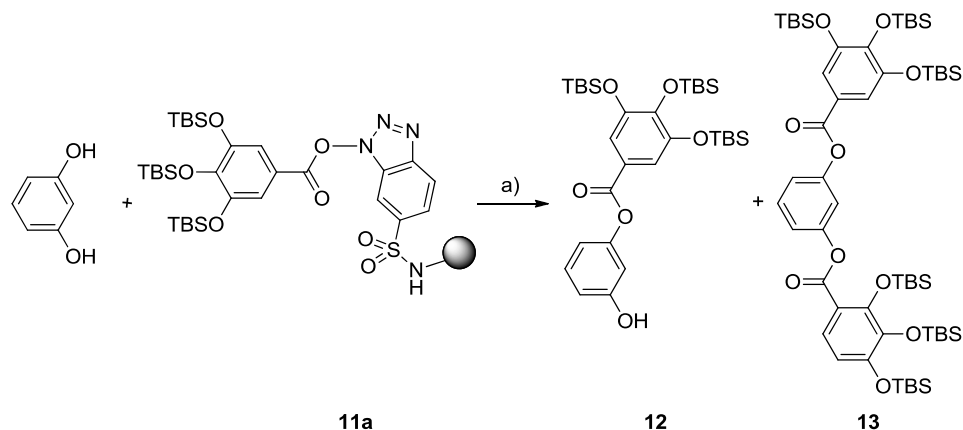
El primer paso de esta metodología consistió en el anclaje del ácido **11** a la resina funcionalizada usando las condiciones previamente descritas:⁶⁵ tras la activación del grupo carboxilo en presencia de diisopropilcarbodiimida (DIC), éste reacciona con el grupo hidroxilo del PS-HOBt en presencia de cantidades catalíticas de DMAP. Tras una etapa de filtración, lavado y secado a vacío se obtiene el ácido activado unido a la resina **11a** (Esquema 5). Es importante señalar que esta reacción transcurre en todos los casos de forma cuantitativa y que el ácido **11a**, una vez activado mediante su unión a la resina, se puede almacenar durante al menos un mes sin perder por ello actividad.



Esquema 5

A continuación se probaron diferentes disolventes y temperaturas para la reacción de esterificación, empleando los equivalentes descritos previamente en la

bibliografía para la obtención del diéster (2.14 equivalentes de ácido activado **11a** por cada equivalente de diol) en presencia de diisopropiletilamina (DIEA) (Esquema 6 y Tabla 2). Una vez completada, la reacción se filtra y el crudo se analiza mediante ^1H -RMN estudiándose la proporción molar de monoéster **12** y/o diéster **13**, en los casos en los que haya tenido lugar la reacción. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.



Reactivos: a) DIEA, disolvente (véase Tabla 2).

Esquema 6

Tabla 2. Estudio del efecto del disolvente y la temperatura en la reacción de esterificación

Disolvente	Temperatura	Monoéster 12 (%) ^a	Diéster 13 (%) ^a
DCM	t.a. ^b	25	75
	reflujo	14	86
Tolueno	t.a.	0	100
	80 °C	Descomposición de la resina	
THF	t.a.	0	100
	reflujo	Descomposición de la resina	
DMF	t.a.	Descomposición de la resina	

^aPorcentaje molar del compuesto en el crudo de reacción determinado mediante ^1H -RMN. ^bt.a.: temperatura ambiente.

Los resultados obtenidos indican que la reacción debe realizarse a temperatura ambiente, ya que por lo general, al calentar se observa

descomposición de la resina. Por otra parte, el uso de *N,N*-dimetilformamida (DMF) no es compatible con la resina ya que se produce su descomposición incluso a temperatura ambiente. Por tanto, se seleccionaron el tolueno y el tetrahidrofurano (THF) como disolventes de la reacción, ya que el uso de DCM dio lugar a mezclas de monoéster **12** y diéster **13**.

Una vez optimizados la temperatura y el disolvente, se estudió el efecto de la estequiometría de la reacción sobre la proporción de mono- y diéster (Tabla 3). Se puede observar cómo en ambos disolventes, al aumentar los equivalentes de ácido activado unido a la resina **11a** aumenta la proporción de diéster **13** obtenido, llegando a ser el único producto de la reacción cuando se usa un exceso de 1.5 equivalentes tanto en tolueno como en THF. Análogamente, cuando se emplea un exceso de diol aumenta la cantidad de monoéster **12** obtenido, pero en este caso solamente llega a ser el único producto de la reacción cuando se usa THF como disolvente. Este hecho puede ser debido a la moderada solubilidad del diol en tolueno. Identificadas las condiciones que nos permiten acceder de forma selectiva a los mono- o diésteres de interés, éstas se emplearán en la síntesis de los nuevos derivados **1** planteados con el fin de estudiar el efecto de la modificación de la subunidad cíclica en la actividad biológica (apartado 3.2.2).

Tabla 3. Estudio de la influencia de la estequiometría de los reactivos en la reacción de esterificación

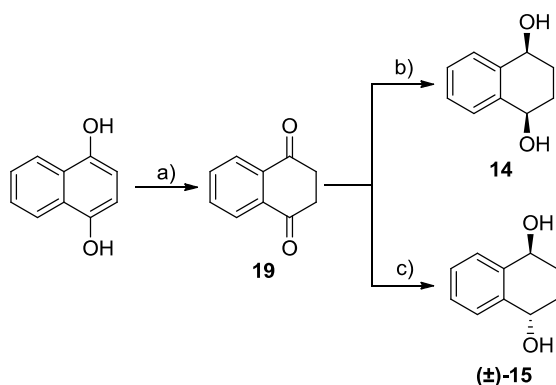
Resina 11a Equivalentes	Diol	Disolvente	Monoéster 12 (%) ^a	Diéster 13 (%) ^a
0.1	1	Tolueno	92	8
0.3	1	Tolueno	95	5
0.5	1	Tolueno	91	9
1	1	Tolueno	28	72
1.5	1	Tolueno	0	100
2.14	1	Tolueno	0	100
0.5	1	THF	100	0
1	1	THF	38	62
1.5	1	THF	0	100
2.14	1	THF	0	100

^aPorcentaje molar del compuesto en el crudo de reacción determinado mediante

¹H-RMN, t.a.: temperatura ambiente.

3.2.2. Modificación de la subunidad cíclica.

Como se comentó anteriormente, como primer paso del proceso *hit to lead* se planteó la nueva serie de compuestos de fórmula **I** en la que se mantienen constantes los dos fragmentos galato y se modifica la subunidad cíclica considerando diferentes sistemas monocíclicos y bicíclicos (Figura 11). La obtención de los nuevos derivados **I** siguiendo la metodología sintética puesta a punto (apartado 3.2.1) implica la esterificación de los dioles adecuados con el ácido gálico protegido anclado a la resina de poliestireno funcionalizada con HOBt (PS-HOBt), seguido de la desprotección de los grupos fenólicos. Para ello, en primer lugar, fue necesario preparar los dioles no comerciales **14-18** siguiendo los métodos descritos previamente en la bibliografía. Así, los 1,2,3,4-tetrahidro-1,4-dihidroxi-naftalenos diastereómeros **14** y **15** se obtuvieron a partir de 1,4-dihidroxi-naftaleno, el cual, por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) se tautomeriza a su forma de 2,3-dihidro-1,4-naftalenodiona (**19**). La reducción selectiva de ésta bien en presencia de tri-*sec*-butilborohidruro de litio (*L-Selectride*®) o bien con hidruro de sodio y bis-dimetoxietoxialuminio (Red-Al®) permitió acceder al diol *cis* **14** o a la mezcla racémica de *trans*-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno-1,4-diol (**±**)-**15**, respectivamente (Esquema 7).⁶⁶

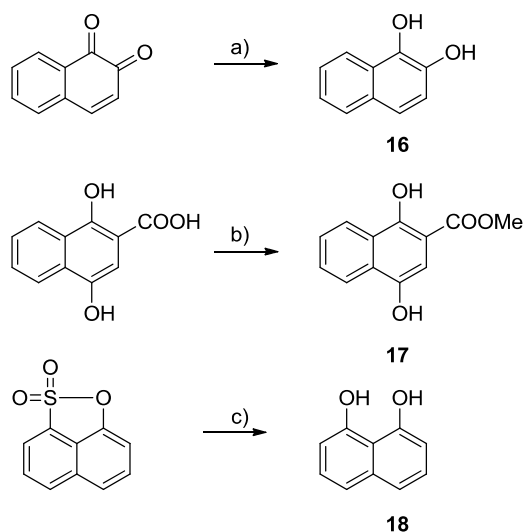


Reactivos: a) TFA; b) *L-Selectride*, DME; c) Red-Al, THF.

Esquema 7

Asimismo, fue preciso preparar 1,2-dihidroxi-naftaleno debido a la baja pureza del compuesto suministrado por la casa comercial. Así, la reducción de 1,2-naftoquinona con borohidruro sódico en etanol permitió obtener 1,2-dihidroxi-naftaleno (**16**) con buen rendimiento (79%),⁶⁷ el cual pudo ser empleado en la siguiente etapa sintética sin necesidad de purificación. Por otro lado, el tratamiento del ácido 1,4-dihidroxi-2-naftoico con sulfato de dimetilo en presencia

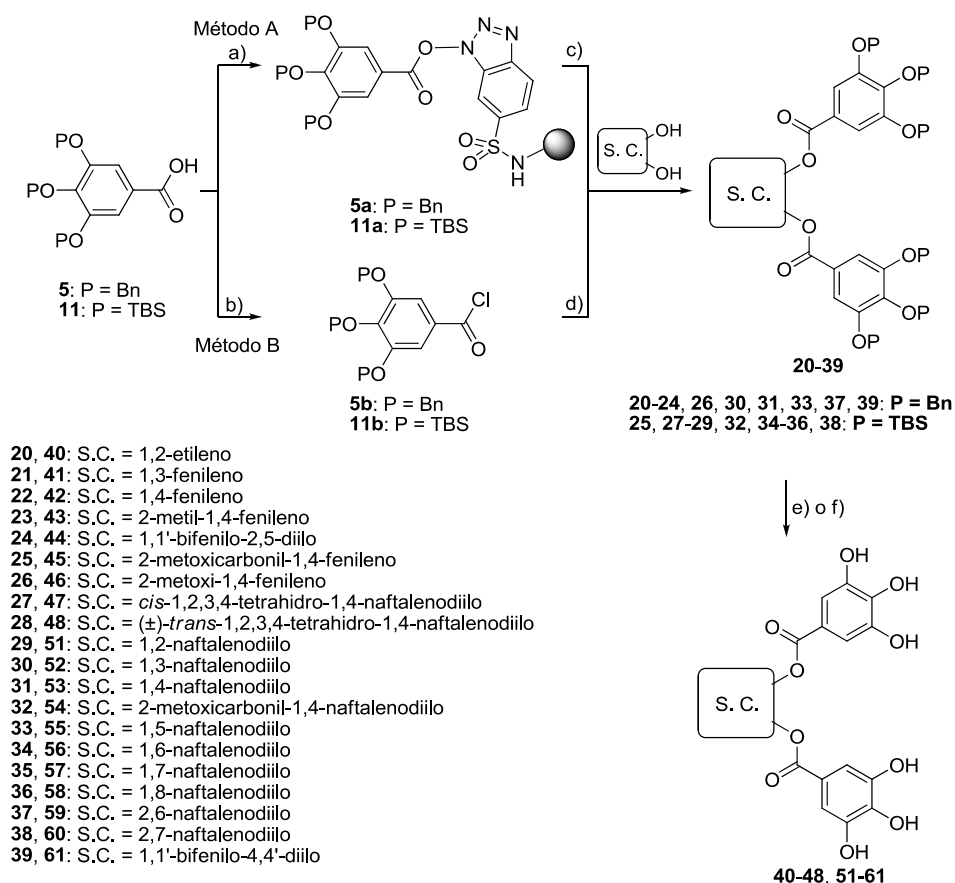
de DIEA dio lugar a 1,4-dihidroxi-2-naftoato de metilo (**17**).⁶⁸ Por último, 1,8-dihidroxinaftaleno (**18**)⁶⁹ se obtuvo mediante fusión alcalina de 1,8-naftosulfona comercial (Esquema 8).



Reactivos: a) NaBH_4 , EtOH ; b) Me_2SO_4 , DIEA, DMF ; c) KOH , Δ .

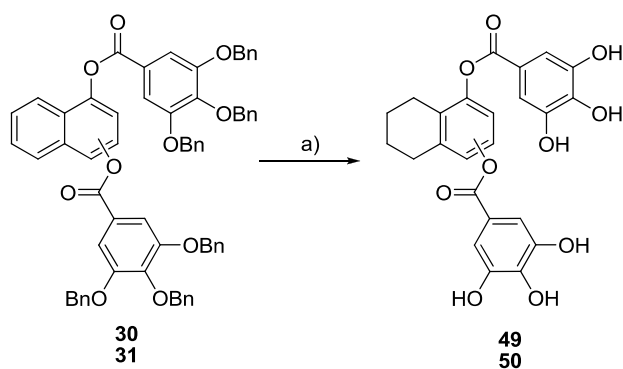
Esquema 8

Para la obtención de los diésteres **20-39**, los ácidos protegidos anclados a la resina (**5a** u **11a**) se hicieron reaccionar con los correspondientes dioles en presencia de DIEA (Esquema 9, Método A). La metodología de reactivos soportados no fue útil en la obtención de los ésteres derivados de 1,1'-bifenilo-2,5-diol (**24**), 2-metiloxycarbonil-1,4-dihidroxibenceno (**25**), 2-metoxycarbonil-1,4-dihidroxinaftaleno (**32**) y 1,8-dihidroxinaftaleno (**36**) en los cuales, probablemente debido al elevado impedimento estérico, la reacción dio lugar a mezclas de productos de mono- y diesterificación. Por lo tanto, estos cuatro ésteres fueron sintetizados por una reacción clásica de condensación a partir del cloruro de ácido gálico convenientemente protegido (**5b** u **11b**), obtenido de forma cuantitativa mediante el tratamiento del correspondiente ácido con cloruro de oxalilo en presencia de cantidades catalíticas de DMF (Esquema 9, Método B). Por último, la eliminación de los grupos protectores de los grupos hidroxilo, ya sea mediante hidrogenación catalítica en el caso de los grupos Bn o mediante un complejo de ácido fluorhídrico-piridina para los intermedios protegidos con TBS, dio lugar a los compuestos finales **40-48**, **51-61** (Esquema 9).



Esquema 9

Asimismo, es importante mencionar que en la hidrogenación de los derivados **30** y **31**, para los que la subunidad cíclica es el 1,3- y el 1,4-naftalenodiilo respectivamente, se obtuvo un subproducto en pequeña proporción (<10%) el cual se pudo evitar controlando el tiempo y la cantidad de catalizador. Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN permitieron caracterizar dicho subproducto como el resultante de la hidrogenación parcial del anillo del naftaleno, identificándose los correspondientes derivados de 5,6,7,8-tetrahidronaftaleno-1,3-diilo y 5,6,7,8-tetrahidronaftaleno-1,4-diilo. La hidrogenación exhaustiva de los ésteres derivados de 1,3-dihidroxinaftaleno (**30**) y 1,4-dihidroxinaftaleno (**31**) permitió obtener los nuevos compuestos finales **49** y **50** con una subunidad bicíclica derivada de tetrahidronaftaleno (Esquema 10).



Reactivos: a) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, EtOH, DCM.

Esquema 10

3.2.3. Modificaciones en el espaciador.

Continuando con el proceso *hit to lead* y con el fin de determinar si el grupo éster podría sustituirse por otro espaciador más resistente a las hidrolasas del suero, se planteó la síntesis de nuevos compuestos de estructura general **I** en los que se mantienen las subunidades cíclicas derivadas de 1,3-naftalenodiilo y 1,1'-bifenilo-4,4'-diilo presentes en los compuestos **52** y **61**, los cuales mostraron las mejores propiedades farmacológicas -como se discutirá en el apartado 3.3- y el grupo éster se sustituye por otros espaciadores X, en principio menos lábiles, tipo amida, éter o cetona (Figura 14).

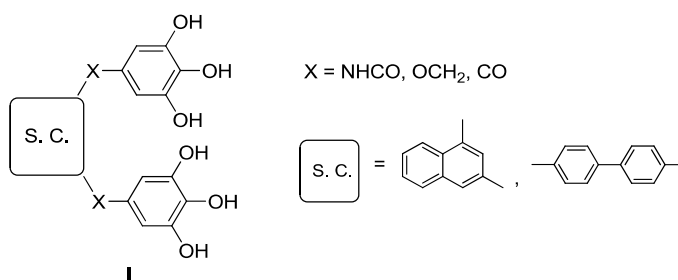
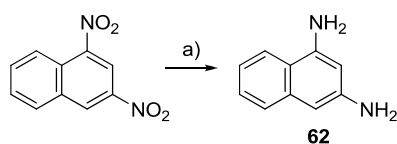


Figura 14. Proceso *hit to lead*: modificaciones en el espaciador.

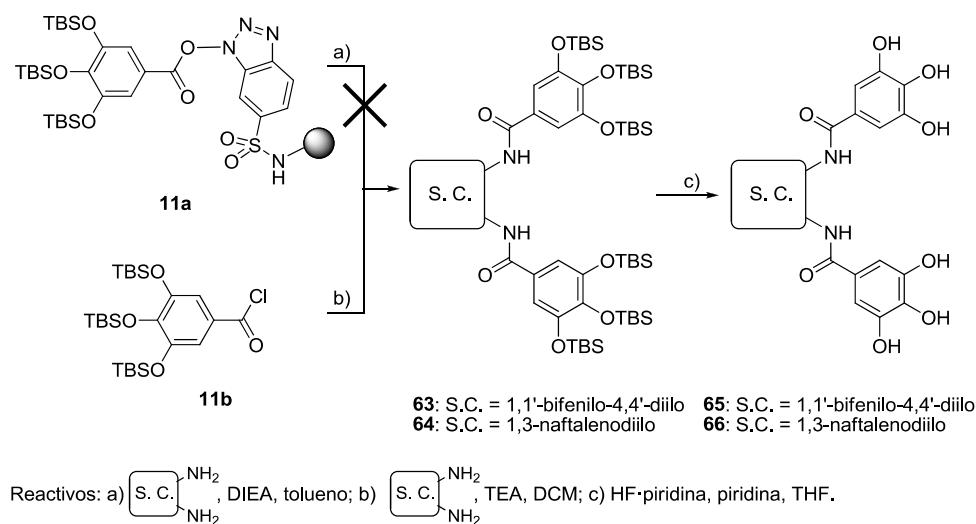
La obtención de las amidas **I** ($\text{X} = \text{NHCO}$) se planteó mediante condensación entre el ácido gálico convenientemente activado y la diamina correspondiente, seguida de desprotección de los grupos hidroxilo. Esta ruta hizo necesaria la síntesis previa de 1,3-naftalenodiamina (**62**) la cual se preparó por hidrogenación catalítica del dinitroderivado correspondiente (Esquema 11).⁷⁰



Reactivos: a) H_2 , Pd/C, MeOH.

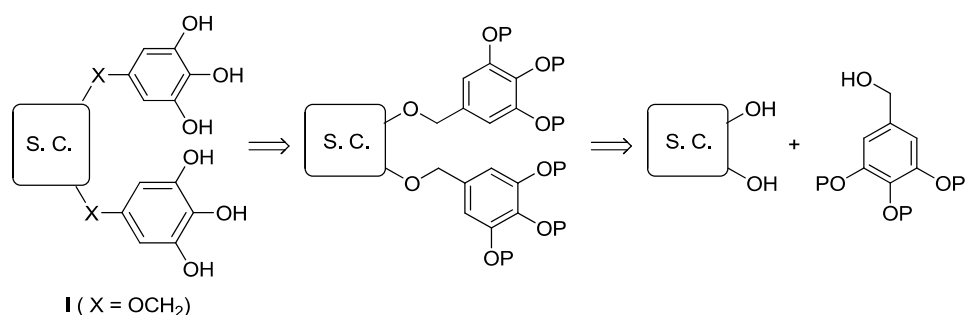
Esquema 11

Para la reacción de formación del enlace amida, en un primer momento se aplicó la metodología sintética basada en el uso de reactivos soportados (Esquema 12), aunque sin éxito en este caso, ya que las reacciones entre las diaminas y el ácido activado anclado a la resina **11a** transcurrieron con bajos rendimientos (<10%) y las diamidas intermedias **63** y **64** protegidas no se aislaban puras. Por lo tanto, éstas finalmente se prepararon mediante reacción entre el cloruro de ácido **11b** y la diamina correspondiente en presencia de trietilamina (TEA). La posterior desprotección de los grupos TBS empleando un complejo de ácido fluorhídrico y piridina dio lugar a las diamidas finales deseadas **65** y **66** (Esquema 12).



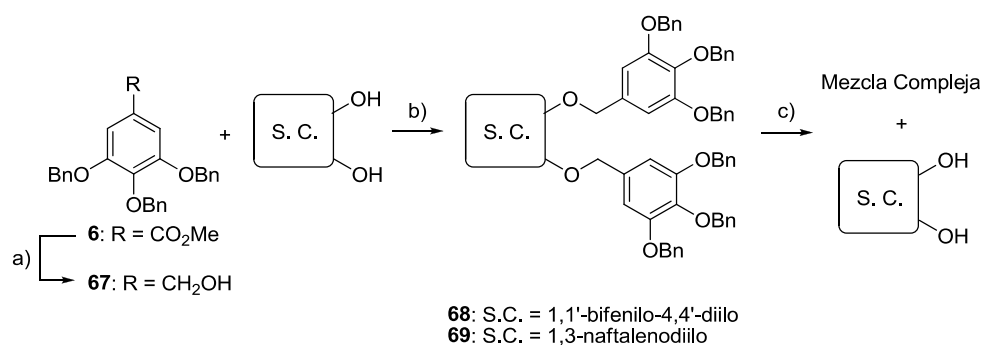
Esquema 12

Por otro lado, la ruta sintética general planteada para los éteres polihidroxílicos **I** ($\text{X} = \text{OCH}_2$) implica la reacción de Mitsunobu del alcohol convenientemente protegido con el diol adecuado, seguida de la desprotección de los grupos hidroxilo (Esquema 13).

**Esquema 13**

En este caso, el empleo del grupo TBS como protector resultó no ser compatible con la ruta sintética, ya que en la etapa final de desprotección se recupera el diol de partida y una mezcla polar compleja. Por ello, se decidió utilizar el grupo Bn para proteger los grupos hidroxilo fenólicos, el cual se ha descrito previamente en la obtención de éteres hidroxílicos similares.⁷¹

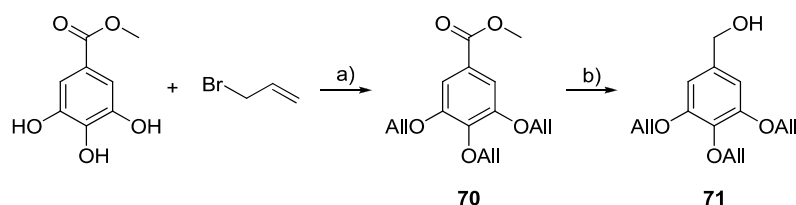
El alcohol protegido **67** se preparó mediante reducción del éster **6** con hidruro de litio y aluminio con muy buen rendimiento (Esquema 14).⁷² En la puesta a punto de las condiciones adecuadas para llevar a cabo la reacción del alcohol sintetizado **67** con el diol correspondiente, los mejores resultados se obtuvieron con la reacción de Mitsunobu modificada utilizando 1,1'-(azodicarbonil)dipiperidina (ADDP), trifenilfosfina y THF como disolvente de la reacción. Estas condiciones permitieron acceder a los intermedios bencilados **68** y **69** (Esquema 14). El último paso de la secuencia consistió en la desprotección de los grupos hidroxilo, pero todos los ensayos de hidrogenación catalítica llevados a cabo resultaron infructuosos, tanto en las condiciones descritas en la bibliografía como variando el tipo y cantidades de catalizador (Pd/C, Pd(OH)₂/C). En todos los casos se obtuvo una mezcla compleja de reacción en la que se observaba el diol de partida.



Reactivos: a) LiAlH₄, THF; b) ADDP, PPh₃, THF; c) H₂, Pd/C o Pd(OH)₂/C, DCM, MeOH.

Esquema 14

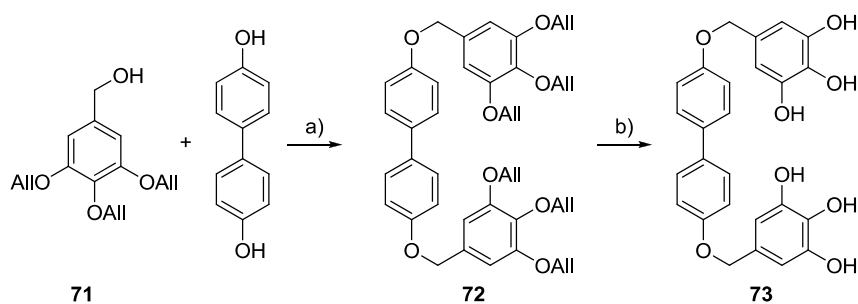
En vista de estos resultados, se decidió utilizar el grupo alilo (All) como protector de los grupos hidroxilo fenólicos, ya que su eliminación en presencia de un éter bencílico es posible usando condiciones suaves.⁷³ Asimismo se seleccionó únicamente el 1,1'-bifenilo-4,4'-diilo como subunidad cíclica. El alcohol bencílico **71** se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía,⁷⁴ consistente en la peralilación de los hidroxilos fenólicos del galato de metilo comercial seguido de la reducción del éster intermedio **70** con hidruro de litio aluminio (Esquema 15).



Reactivos: a) K₂CO₃, DMF; b) LiAlH₄, THF.

Esquema 15

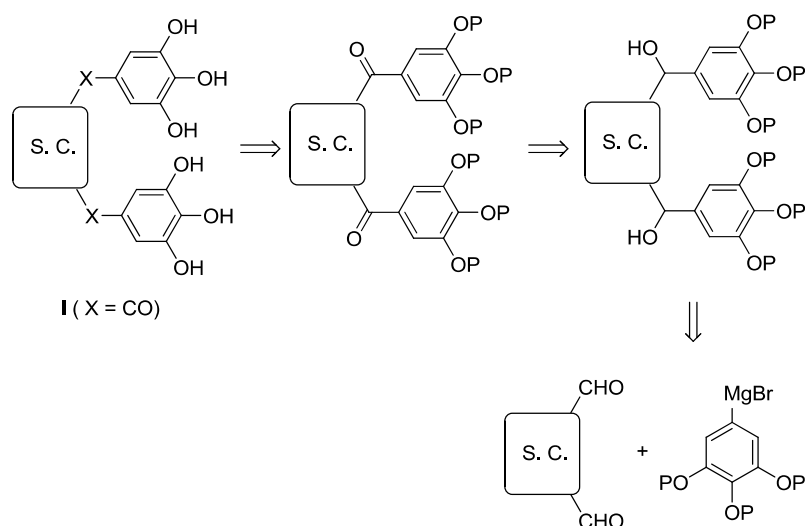
La reacción de Mitsunobu entre el alcohol bencílico **71** y 1,1'-bifenilo-4,4'-diol usando las condiciones optimizadas anteriormente permitió la obtención del derivado protegido **72**. Por último, el éter final deseado **73** se obtuvo mediante la desprotección de los grupos All, empleando tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) y el ácido *N,N*-dimetilbarbitúrico (DMBA) como carbo-nucleófilo aceptor de los All salientes (Esquema 16).



Reactivos: a) ADDP, PPh_3 , THF; b) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, DMBA, MeOH, DCM.

Esquema 16

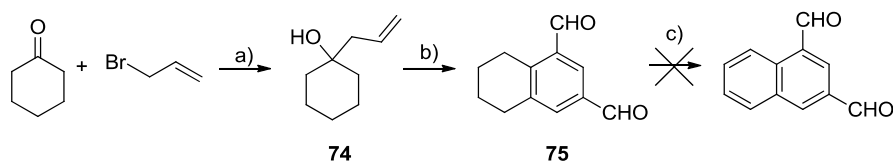
Por último, la ruta planteada para la obtención de los compuestos polihidroxicetonicos **I** ($\text{X} = \text{CO}$) implicó tres etapas: reacción entre el reactivo de Grignard y el dialdehído adecuado, oxidación de los alcoholes secundarios a las correspondientes cetonas y desprotección de los grupos hidroxilo (Esquema 17).



Esquema 17

Con respecto a los dialdehídos necesarios para la reacción con el magnesiano, 1,1'-bifenil-4,4'-dicarbaldehído es comercial y la síntesis de 1,3-naftalenodicarbaldehído se abordó siguiendo su descripción en la bibliografía (Esquema 18).⁷⁵ Así, la reacción de Barbier-Grignard entre ciclohexanona y bromuro de alilo en presencia de magnesio y cantidades catalíticas de yodo proporcionó con elevado rendimiento el alcohol homoalílico **74**.⁷⁶ Este alcohol, en

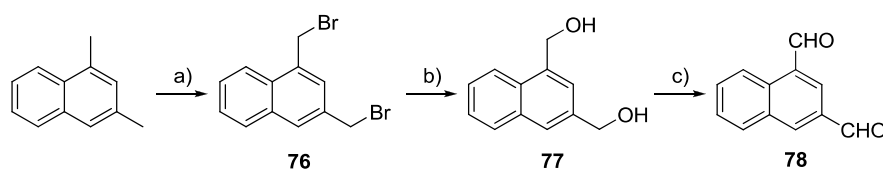
presencia del reactivo de Vilsmeier, generado *in situ* a partir de una mezcla equimolecular de DMF y oxiclورو de fósforo, dio lugar con bajo rendimiento a 5,6,7,8-tetrahidronaftaleno-1,3-dicarbaldehído (**75**).⁷⁵ Sin embargo, la aromatización de **75** a naftaleno-1,3-dicarbaldehído con 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ) siguiendo el procedimiento previamente descrito⁷⁵ no se pudo verificar en nuestras manos, por lo que se tuvo que seguir una ruta sintética alternativa.



Reactivos: a) Mg, I₂ cat., (CH₂)Cl₂, Et₂O; b) POCl₃/DMF, DMF; c) DDQ.

Esquema 18

Así, la bromación radicalaria de 1,3-dimetilnaftaleno con *N*-bromosuccinimida (NBS) utilizando cantidades catalíticas del iniciador radicalario 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN) proporcionó el derivado 1,3-bis(bromometil)naftaleno **76**. A continuación se realizó la sustitución del átomo de bromo por el grupo hidroxilo, aislándose **77** con rendimiento cuantitativo y sin necesidad de separación cromatográfica. Por último, la oxidación de los grupos hidroxilo con clorocromato de piridinio (PCC) permitió la obtención del dicarbaldehído deseado **78**⁷⁷ (Esquema 19).



Reactivos: a) NBS, AIBN, CHCl₃; b) CaCO₃, H₂O, 1,4-dioxano; c) PCC, DCM.

Esquema 19

Una vez sintetizados los dicarbaldehídos y teniendo en cuenta el esquema retrosintético (véase Esquema 17), se procedió a la puesta a punto de las condiciones experimentales para la reacción de Grignard, empleando 1,1'-bifenil-4,4'-dicarbaldehído comercial como sustrato de la reacción y yodo como activador del magnesio metálico. En este caso, la disponibilidad comercial de 5-bromo-1,2,3-

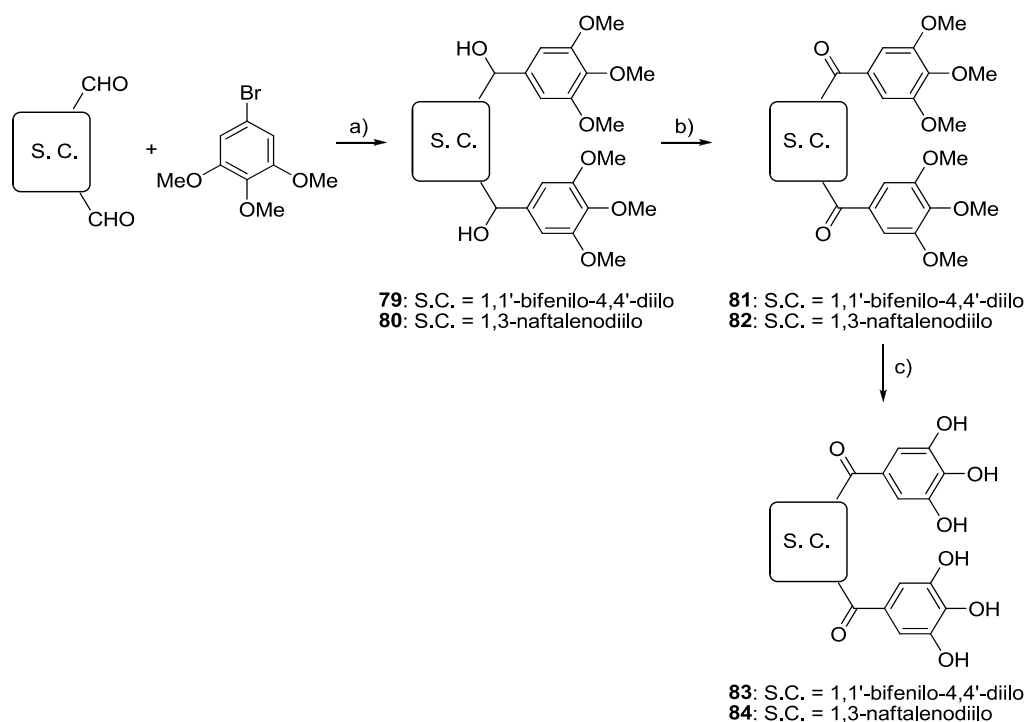
trimetoxibenceno lleva implícita la protección de los grupos hidroxilo en forma de éteres metílicos a lo largo de toda la ruta sintética (Esquema 20). En los diferentes experimentos ensayados se modificaron la temperatura, el tiempo, el disolvente de la reacción, la relación estequiométrica de los reactivos y el coactivador del magnesio. La reacción se siguió por cromatografía en capa fina (c.c.f.) y en aquellos casos en los que se observó el producto de reacción deseado **79**, se realizó su separación cromatográfica y se determinó el rendimiento de la reacción (Tabla 4).

Tabla 4. Optimización de condiciones de la reacción de Grignard para la obtención de **79**

Temperatura	Tiempo (h)	Disolvente	Equivalentes ^a	Coactivador	Rto
t.a.	1	THF	1 : 2.5	Dicloroetano	N.D. ^b
Reflujo	24	THF	1 : 2.5	Dicloroetano	N.D.
Reflujo	24	Éter	1 : 4	Dibromoetano	N.D.
t.a.	2	THF	1 : 4	Dibromoetano	25%
t.a.	24	THF	1 : 4	Dibromoetano	25%
Reflujo	24	THF	1 : 4	Dibromoetano	N.D.

^adicarbaldehído : derivado bromado; ^bNo se detecta producto, t.a. temperatura ambiente.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos (Tabla 4), la síntesis de los dioles **79** y **80** se llevó a cabo utilizando dibromoetano como coactivador, en THF anhidro y a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, la oxidación de los dioles anteriores con dicromato de piridinio (PDC) en DCM sobre tamices moleculares dio lugar a los derivados dicarbonílicos **81** y **82**, respectivamente. Por último, la desprotección de los grupos hidroxilo con tribromuro de boro permitió la obtención de los productos finales deseados **83** y **84** con buenos rendimientos (Rto~50-70%) (Esquema 20).



Reactivos: a) Mg, I₂ cat., dibromoetano, THF; b) PDC, DCM, tamices; c) BBr₃, DCM.

Esquema 20

3.2.4. Estudio de la influencia de los grupos hidroxilo.

El siguiente paso en el proceso *hit to lead* fue el estudio del efecto del número y la posición de los grupos hidroxilo en la actividad biológica de esta familia de inhibidores de FASN. Para ello, se decidió diseñar y sintetizar una pequeña serie de compuestos **I** en la cual se elimina progresivamente el número de grupos hidroxilo (R₁-R₃, R'₁-R'₃) considerando las subunidades cíclicas de 1,3-naftalenodiilo y 1,1'-bifenilo-4,4'-diilo y el grupo éster como espaciador (Figura 15), ya que los derivados **52** y **61** mostraron las mejores propiedades farmacológicas (véase apartado 3.3, Tabla 6).

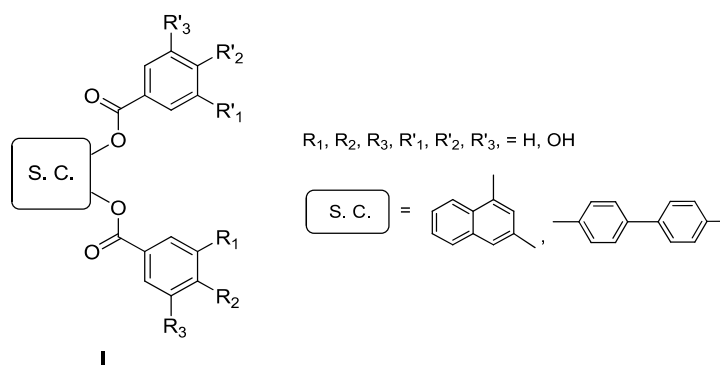
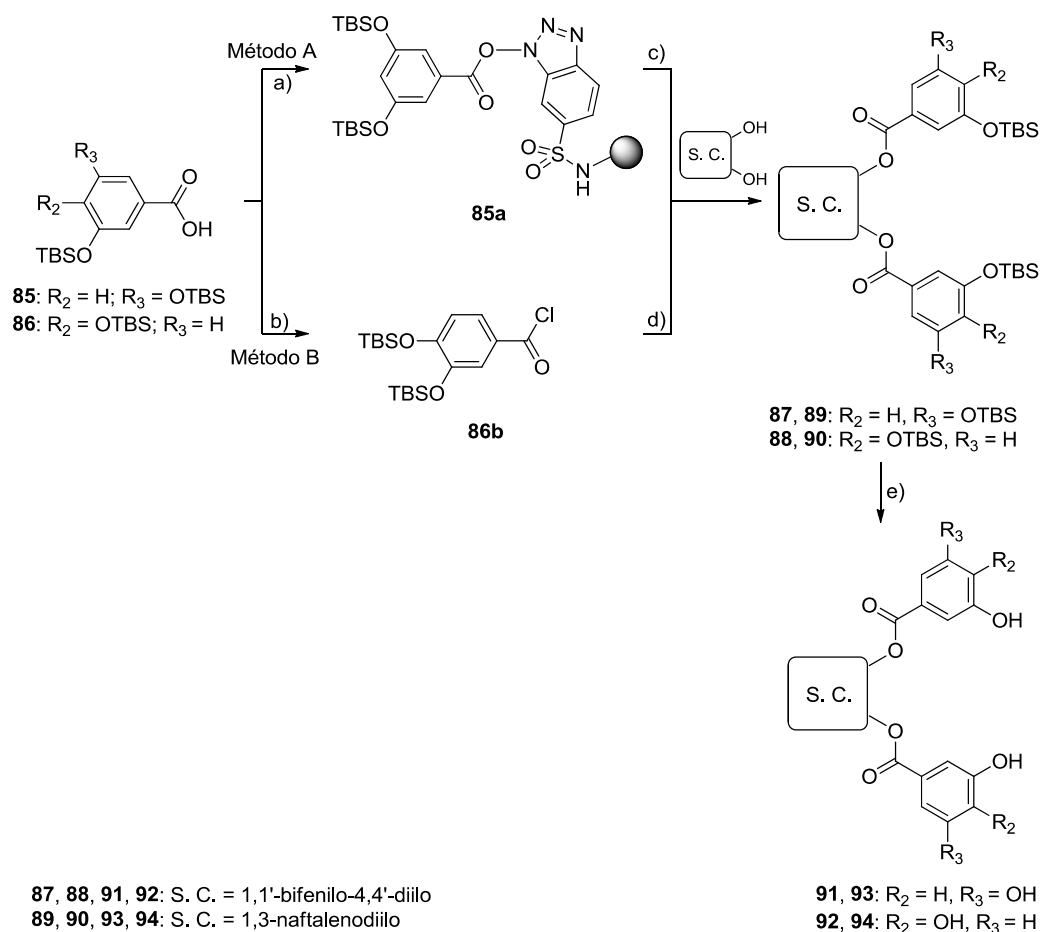


Figura 15. Proceso *hit to lead*: estudio del efecto del número y la posición de los grupos hidroxilo.

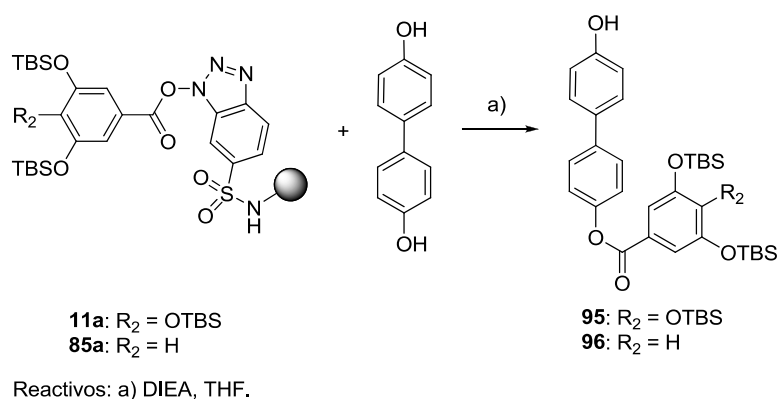
La ruta sintética general planteada para los nuevos diésteres **I** (**91-94**) en los que los dos grupos acilo son iguales es similar a la discutida anteriormente para los derivados de galato empleando reactivos soportados. En primer lugar, a partir de los ácidos α -resorcílico (ácido 3,5-dihidroxibenzoico) y protocatecuico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico) se obtuvieron los derivados protegidos con TBS **85** y **86**, respectivamente, que fueron a continuación anclados a la resina de HOBt, empleando las condiciones habituales. Así, la reacción posterior del ácido activado **85a** con el diol adecuado dio lugar a los diésteres intermedios **87** y **89** (Método A, Esquema 21). Sin embargo, esta metodología no dio buenos resultados en el caso del ácido 3,4-bis(*terc*-butildimetilsililo)benzoico **86** debido probablemente a factores electrónicos que inducen una baja reactividad del ácido anclado a la resina. Por lo tanto, los diésteres intermedios **88** y **90** fueron sintetizados por una reacción clásica de condensación a partir del cloruro de ácido **86b** (Método B, Esquema 21). Por último, la eliminación de todos los grupos TBS dio lugar a los compuestos finales **91-94** (Esquema 21).



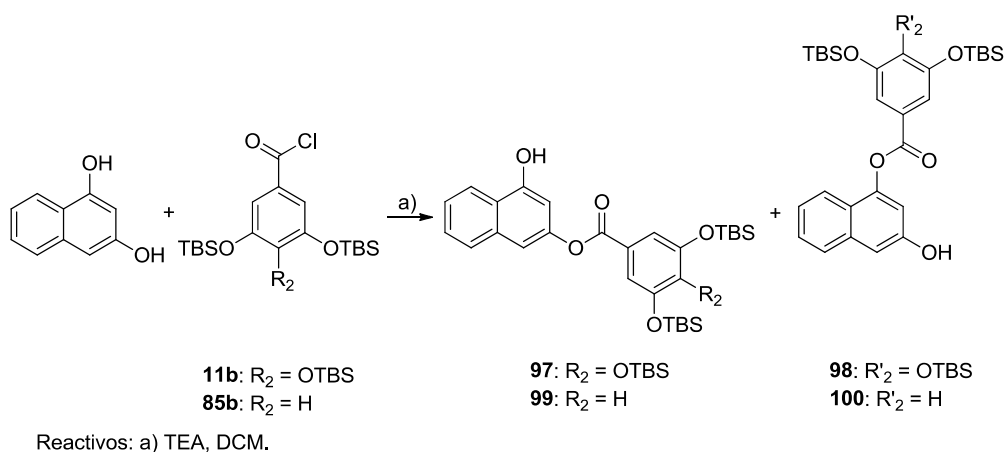
Esquema 21

La ruta sintética planteada para la obtención de los derivados **I** no simétricos implica dos reacciones sucesivas de esterificación seguidas de la desprotección de los grupos hidroxilo. En principio se aplicó la metodología basada en el uso de reactivos soportados, la cual dio buenos resultados en el caso de los derivados de 1,1'-bifenilo-4,4'-diol **95** y **96** empleando las condiciones de reacción optimizadas con anterioridad para la obtención de los monoésteres (véase apartado 3.2.1), que implican el uso de THF como disolvente de la reacción y 0.5 equivalentes de ácido activado unido a la resina (**11a** u **85a**) por cada equivalente de diol empleado (Esquema 22). Sin embargo, cuando se aplicó esta metodología a la síntesis de los monoésteres derivados de 1,3-naftalenodiol, se obtuvo la mezcla de los dos

posibles regioisómeros. Esto es debido a que la reacción no es quimioselectiva, lo que hace necesaria una etapa cromatográfica para aislar los dos isómeros obtenidos. Asimismo, la reacción transcurre con bajo rendimiento (<10%), al igual que cuando se realiza la reacción de esterificación en disolución usando como agente activante DCC en presencia de DMAP (R_{to} = 10-25%). Por ello los monoésteres **97-100** se prepararon mediante reacción entre el cloruro de ácido correspondiente (**11b** u **85b**) y 1,3-dihidroxinaftaleno. La mezcla de monoésteres obtenidos (**97,98** ó **99,100**) se separan por cromatografía en columna (Esquema 23).



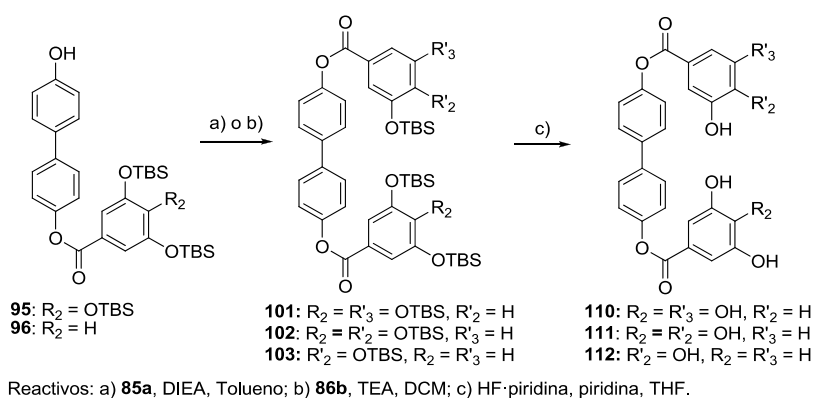
Esquema 22



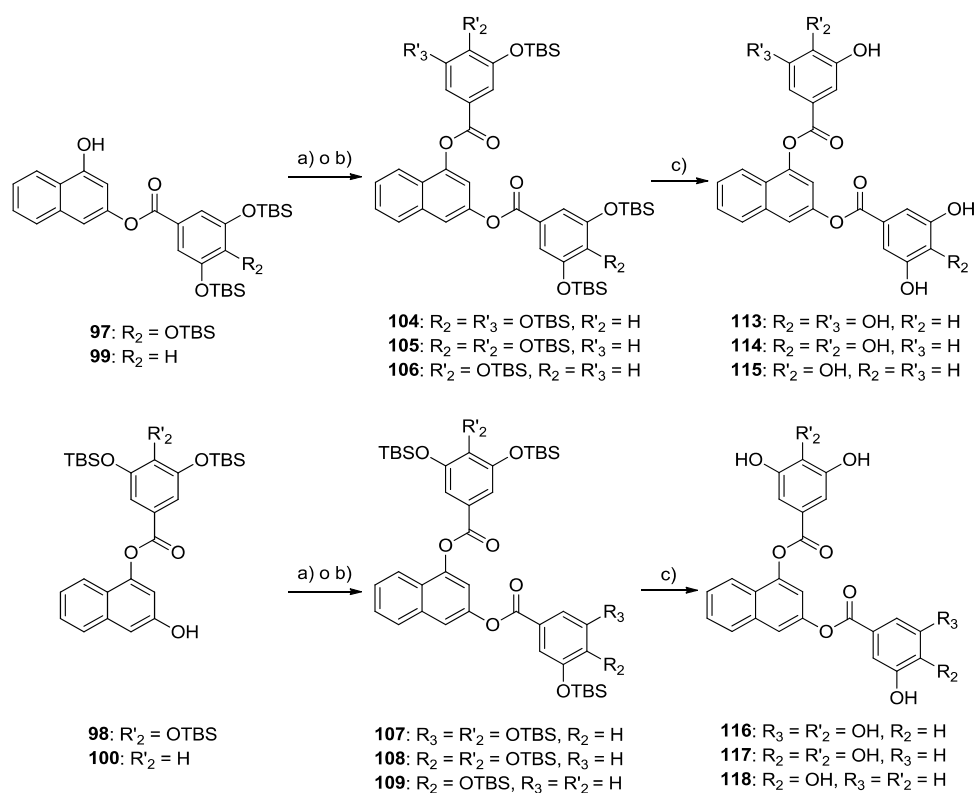
Esquema 23

Finalmente la reacción de los monoésteres **95-100** con el ácido anclado a la resina **85a** o con el cloruro de ácido **86b** seguida de la desprotección de los

grupos hidroxilo permitió acceder a los compuestos finales deseados **110-118** (Esquemas 24 y 25).



Esquema 24



Esquema 25

3.2.5. Capacidad para inhibir la proliferación de células tumorales y la actividad de FASN.

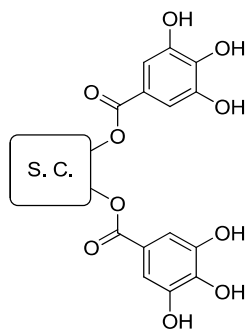
La capacidad de los compuestos **40-61**, **65**, **66**, **73**, **83**, **84**, **91-94** y **110-118** para inhibir la proliferación celular de la línea de cáncer de mama SK-Br3 y la actividad de FASN se determinó siguiendo las metodologías anteriormente descritas (apartado 3.1.2). Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 5-7.

El análisis cualitativo de la relación estructura-actividad de los nuevos compuestos sintetizados puede expresarse en los siguientes términos:⁷⁸⁻⁸⁰

- a) En lo referente a la subunidad cíclica (S. C.) (Tabla 5), se puede concluir que los mejores valores de citotoxicidad los presentan los compuestos en los que dicha subunidad está formada por dos anillos aromáticos, ya sean fusionados (derivados de naftaleno) o aislados (derivados de bifenilo). En cuanto a la posición relativa de los grupos galóilo, se puede observar cómo a medida que éstos se alejan entre sí aumenta la actividad citotóxica de los compuestos. Los compuestos que mostraron los mejores valores de citotoxicidad e inhibición de FASN fueron los derivados **52** y **61**, con subunidades cíclicas de 1,3-naftalenodiilo y 1,1'-bifenilo-4,4'-diilo.
- b) Seleccionando las mejores subunidades cíclicas mencionadas se realizaron cambios en la estructura del espaciador X (Tabla 6). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la sustitución del grupo éster por un grupo amida, éter o cetona conlleva una pérdida completa de la actividad citotóxica. Por lo tanto, se consideró el grupo éster como espaciador en la siguiente etapa de optimización.
- c) Por último, en lo referente al número y a la posición de los grupos hidroxilo, los resultados obtenidos (Tabla 7) muestran que, aunque hay combinaciones que mejoran la capacidad citotóxica de los compuestos, dichas combinaciones también disminuyen significativamente la capacidad inhibitoria de la actividad de FASN. Así, el mejor radical hidroxilado encontrado es el 3,4,5-trihidroxifenilo.

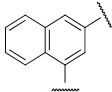
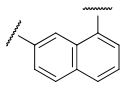
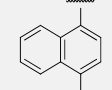
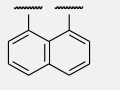
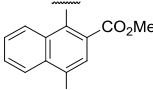
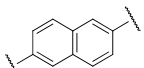
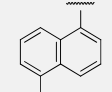
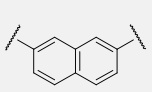
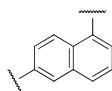
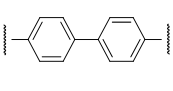
Por lo tanto, de todos los compuestos sintetizados en el proceso *hit to lead*, los derivados **52**, **53** y **61** fueron seleccionados como *leads* y se continuó con su caracterización farmacológica.

Tabla 5. Citotoxicidad e inhibición de la actividad de FASN de los compuestos **I** (1-4, 40-61)

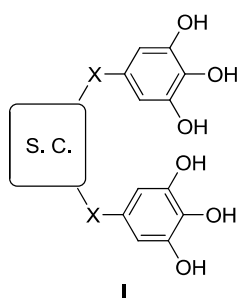


Comp.	S. C.	Cl ₅₀ (μM) ^a	Inhibición de FASN (%) ^b	Comp.	S. C.	Cl ₅₀ (μM) ^a	Inhibición de FASN (%) ^b
1		> 150	N.I. ^c	44		17 ± 2	N.I.
2		> 150	N.I.	45		36 ± 7	43 ± 8
3		125 ± 5	21 ± 5	46		8 ± 1	N.I.
4		76 ± 9	31 ± 4	47		22 ± 4	N.I.
40		> 150	N.D. ^d	48		42 ± 5	41 ± 7
41		42 ± 7	N.I.	49		31 ± 3	N.I.
42		25 ± 4	N.I.	50		41 ± 3	N.I.
43		23 ± 2	N.I.	51		74 ± 2	N.D.

Tabla 5. (Continuación)

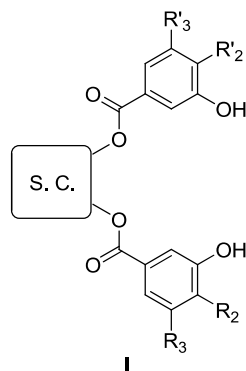
Comp.	S. C.	Cl ₅₀ (μM) ^a	Inhibición de FASN (%) ^b	Comp.	S. C.	Cl ₅₀ (μM) ^a	Inhibición de FASN (%) ^b
52		21 ± 7	90 ± 4	57		47 ± 8	N.I.
53		29.0 ± 0.3	69 ± 19	58		78 ± 4	N.I.
54		28 ± 6	N.I.	59		5 ± 1	N.I.
55		26 ± 3	30 ± 6	60		26 ± 10	N.I.
56		39 ± 8	N.I.	61		4 ± 1	90 ± 5
Cerulenina		26 ± 5	4.5 ^e	EGCG		149 ± 20	18%

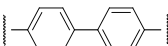
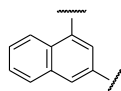
^aLos valores de Cl₅₀ corresponden a los valores medios ± E.E. obtenidos en un mínimo de dos experimentos independientes realizados por triplicado. ^bLos valores de inhibición de FASN fueron determinados a una concentración igual al valor de Cl₅₀ obtenido para la inhibición de la proliferación de células SK-Br3 y corresponden al valor medio y E.E. de un mínimo de dos experimentos independientes realizados por duplicado. ^cN.I. Inhibición no significativa de la actividad enzimática de FASN a la concentración ensayada. ^dN.D. Inhibición enzimática de FASN no determinada para valores de Cl₅₀ > 50 μM. ^eValor de Cl₅₀ de inhibición de FASN para la cerulenina. Véase ref. 31.

Tabla 6. Citotoxicidad de los compuestos con diferentes espaciadores

Comp.	S. C.	X	Cl ₅₀ (μM) ^a
61		OCO	4 ± 1
65		NHCO	> 150
73		OCH ₂	67 ± 5
83		CO	> 150
52		OCO	21 ± 7
66		NHCO	> 150
84		CO	> 150

^aLos valores de Cl₅₀ corresponden a los valores medios y E.E. obtenidos en un mínimo de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

Tabla 7. Citotoxicidad e inhibición de la actividad de FASN de los compuestos **I** (91-94, 110-118)

S. C.	Comp.	R ₂	R ₃	R' ₂	R' ₃	Cl ₅₀ (μM) ^a	Inhibición de FASN (%) ^b
	61	OH	OH	OH	OH	4 ± 1	90 ± 5
	91	H	OH	H	OH	7 ± 2	N.I. ^c
	92	OH	H	OH	H	89 ± 4	N.D. ^d
	110	OH	OH	H	OH	5 ± 1	N.I.
	111	OH	OH	OH	H	2.5 ± 0.3	24 ± 3
	112	H	OH	OH	H	7 ± 1	50 ± 5
	52	OH	OH	OH	OH	21 ± 7	90 ± 4
	93	H	OH	H	OH	107 ± 30	N.D.
	94	OH	H	OH	H	21 ± 11	23 ± 9
	113	OH	OH	H	OH	18 ± 3	N.I.
	114	OH	OH	OH	H	8 ± 3	N.I.
	115	H	OH	OH	H	17 ± 3	N.I.
	116	H	OH	OH	OH	21 ± 4	42 ± 6
	117	OH	H	OH	OH	8 ± 2	47 ± 3
	118	OH	H	H	OH	22 ± 5	41 ± 4

^aLos valores de Cl₅₀ corresponden al valor medio y E.E. obtenidos en un mínimo de dos experimentos independientes realizados por triplicado. ^bLos valores de inhibición de FASN fueron determinados a una concentración igual al valor de Cl₅₀ obtenido para la inhibición de la proliferación de células SK-Br3 y corresponden al valor medio y E.E. de un mínimo de dos experimentos independientes realizados por duplicado. ^cN.I. Inhibición no significativa de la actividad enzimática de FASN a la concentración ensayada. ^dN.D. Inhibición enzimática de FASN no determinada para valores de Cl₅₀ > 50 μM.

3.3. Caracterización farmacológica de los *leads*.

3.3.1. Contribución de la inhibición de la actividad de FASN a la citotoxicidad celular.

En la Tabla 5 se puede observar cómo hay compuestos en los que la citotoxicidad obtenida en células SK-Br3 es similar a la de los compuestos seleccionados **52**, **53** y **61**, y, sin embargo no inhiben la actividad de la enzima FASN. Éste es el caso, por ejemplo, del compuesto **59** que, con una CI_{50} de 5 μ M similar a la del derivado **61** (CI_{50} = 4 μ M), no ejerce efecto inhibitorio alguno sobre FASN. Este hecho sugiere la existencia de mecanismos adicionales a la inhibición de FASN implicados en la citotoxicidad celular observada. Con el fin de confirmar que la inhibición de la actividad de FASN es el mecanismo principal de citotoxicidad en los compuestos identificados, se estudió el efecto de los compuestos **52**, **53** y **61** en células SK-Br3 en las que se ha silenciado previamente la expresión de FASN.

Si la citotoxicidad observada está mediada por la inhibición de la actividad de FASN, en ausencia de dicha enzima los compuestos deberían reducir su capacidad citotóxica. Para ello, las células SK-Br3 se trataron con un RNA pequeño interferente (siRNA) específico de FASN, el cual produce una disminución significativa de los niveles de expresión de FASN. Una vez verificado que la transfección con este siRNA disminuye la expresión de FASN en un 80% (semicuantificado por densitometría de la banda correspondiente, Figura 16B), se determinó la viabilidad celular en células transfectadas con el siRNA de FASN y en células control cuyos niveles de expresión de FASN no han sido modificados. En la Figura 16A se muestran a modo de ejemplo los resultados obtenidos para el compuesto **61**. Se puede observar cómo dicho derivado no induce ningún efecto significativo en las células tratadas con el siRNA de FASN, es decir, con menores niveles de esta enzima. Por lo tanto, la citotoxicidad de los derivados **52**, **53** y **61** se debe directamente a su capacidad para inhibir la actividad de FASN, de modo que en presencia de niveles bajos de esta enzima, los compuestos pierden su capacidad citotóxica. Estos resultados confirman que el principal mecanismo implicado en la muerte celular inducida por los *leads* **52**, **53** y **61** es la inhibición de la actividad de FASN.

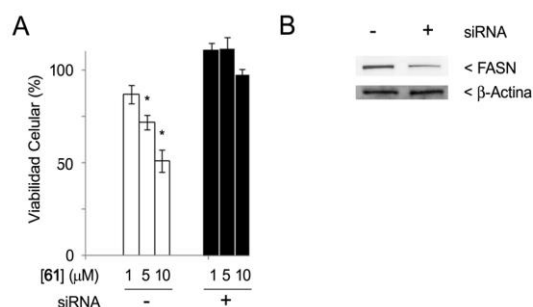


Figura 16. (A) Citotoxicidad del compuesto **61** en células SK-Br3 transfectadas con un siRNA específico de FASN (+) y en células control (-). (B) Análisis mediante *western blot* de la expresión de FASN en células SK-Br3 transfectadas con el siRNA de FASN (+) y control (-). Se muestra la banda obtenida para la β-actina como control de carga. La imagen mostrada es representativa de las obtenidas en al menos dos ensayos independientes.

3.3.2. Estudio de citotoxicidad en un panel de líneas tumorales.

A continuación se determinó la capacidad citotóxica de los derivados **52**, **53** y **61** en un amplio panel de líneas tumorales provenientes de diferentes órganos (Tabla 8). Asimismo, para correlacionar la citotoxicidad observada con el grado de expresión de FASN, se determinaron los niveles de FASN en las líneas celulares ensayadas más representativas (Figura 17).

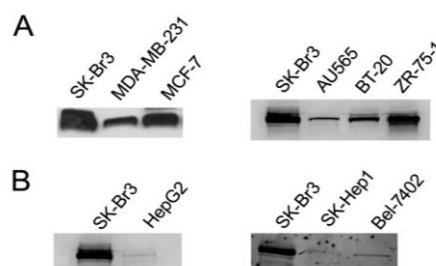


Figura 17. Niveles de expresión de FASN en líneas tumorales de mama (A) y de hígado (B). Las imágenes mostradas son representativas de las obtenidas en al menos dos experimentos independientes.

Tabla 8. Citotoxicidad de los compuestos **52**, **53** y **61** en diferentes líneas celulares tumorales

Órgano de Origen	Línea Celular	CI ₅₀ (μM) ^a		
		Comp. 52	Comp. 53	Comp. 61
Colon	HCT116	23 ± 1	116 ± 47	4 ± 2
Páncreas	PANC-1	35 ± 4	> 150	2.1 ± 0.5
Piel	A431	22 ± 3	44 ± 1	1.4 ± 0.1
Hígado	HepG2	11 ± 5	99 ± 30	70 ± 21
	Bel-7402	130 ± 20	> 150	40 ± 3
	SK-Hep1	> 150	> 150	56 ± 1
Ovario	SK-OV3	> 150	> 150	5 ± 2
Mama	SK-Br3	21 ± 7	29.0 ± 0.3	4 ± 1
	AU565	82 ± 5	80 ± 12	24 ± 5
	BT20	63 ± 37	90 ± 13	17 ± 2
	MCF-7	88 ± 18	44 ± 16	3.8 ± 0.8
	ZR-75-1	21 ± 2	32 ± 3	1.9 ± 0.3
	MDA-MB-231	79 ± 4	63 ± 11	5 ± 3
Pulmón	HCC827	29 ± 9	57 ± 8	14 ± 8
	H460	11 ± 3	74 ± 5	9 ± 1
	A549	33 ± 4	> 150	17 ± 10

^aLos valores de CI₅₀ corresponden al valor medio ± E.E. obtenidos en un mínimo de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

En general, los nuevos inhibidores de FASN presentan citotoxicidades de moderadas a buenas en las líneas celulares ensayadas, siendo el derivado **61** el que muestra el mejor perfil de citotoxicidad, con valores de CI₅₀ inferiores a 10 μM en las líneas HCT116, PANC-1, A431, SK-OV3, SK-Br3, MCF-7, ZR-75-1, MDA-MB-231 y H460 (Tabla 8). Asimismo, se comprueba cómo, en general, las líneas

tumorales con mayor expresión de FASN son más sensibles a los nuevos inhibidores **52**, **53** y **61** (Figura 17). Por ejemplo, los valores de CI_{50} de los compuestos (Tabla 8) son menores en las líneas de cáncer de mama SK-Br3, MDA-MB-231, MCF-7 y ZR-75-1 que en las líneas tumorales en las que la expresión de FASN es menor (BT-20 y AU-565, Figura 17A). Esta correlación entre niveles de expresión de FASN e inhibición de la proliferación celular también se puede observar en el caso de las líneas tumorales de hígado HepG2, SK-Hep1 y Bel-7402, cuyos niveles de expresión de FASN son muy bajos (Figura 17B), lo que correlaciona con valores de citotoxicidad moderados y bajos (Tabla 8). En conjunto, todos estos resultados apoyan firmemente la inhibición de la actividad de FASN como estrategia eficaz para frenar la proliferación tumoral así como el potencial de los nuevos inhibidores desarrollados, lo que nos llevó a profundizar en el estudio tanto del mecanismo como de las rutas de señalización implicadas en la citotoxicidad observada.

3.3.3. Estudio del mecanismo molecular de la muerte celular y rutas de señalización.

Para establecer el mecanismo de acción de los nuevos inhibidores, en primer lugar se estudió el proceso de muerte celular, que puede ser básicamente de dos tipos, necrosis o apoptosis. Una de las principales características del mecanismo apoptótico es la activación de las caspasas, un conjunto de enzimas que llevan a cabo una degradación programada de ciertas proteínas, lo que acaba produciendo la muerte celular. Una de las proteínas que sufren dicha degradación es la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), que originalmente tiene un tamaño de 116 kDa y que cuando es hidrolizada da lugar a una proteína de 89 kDa. Tanto la enzima completa como su fragmento pueden ser detectados empleando anticuerpos específicos. Con el fin de determinar si los compuestos **52**, **53** y **61** inducen apoptosis, se llevó a cabo la incubación de células tumorales SK-Br3 durante diferentes tiempos en presencia de los nuevos compuestos a una concentración igual a la CI_{50} obtenida en el ensayo previo de citotoxicidad, determinándose la hidrólisis de PARP mediante la detección de su fragmento de 89 kDa (Figura 18). Se puede observar cómo los derivados **52**, **53** y **61** inducen la degradación de la enzima PARP, lo que indica que la muerte celular observada en las células SK-Br3 se produce por medio de apoptosis. Este mecanismo se confirmó con estudios complementarios llevados a cabo mediante citometría de flujo, en los cuales se detectó el aumento de expresión de la proteína anexina V, un claro marcador apoptótico (resultados no mostrados).

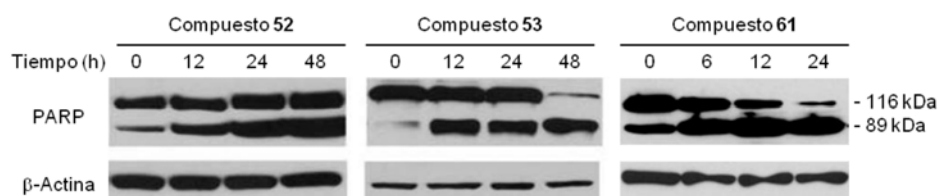


Figura 18. Los *leads* identificados **52**, **53** y **61** inducen apoptosis de las células SK-Br3, como indica la aparición del fragmento de la proteína PARP de 89 kDa. Se muestra la banda correspondiente a la β-actina, proteína empleada como control de carga. Las imágenes mostradas son representativas de las obtenidas en al menos dos ensayos independientes.

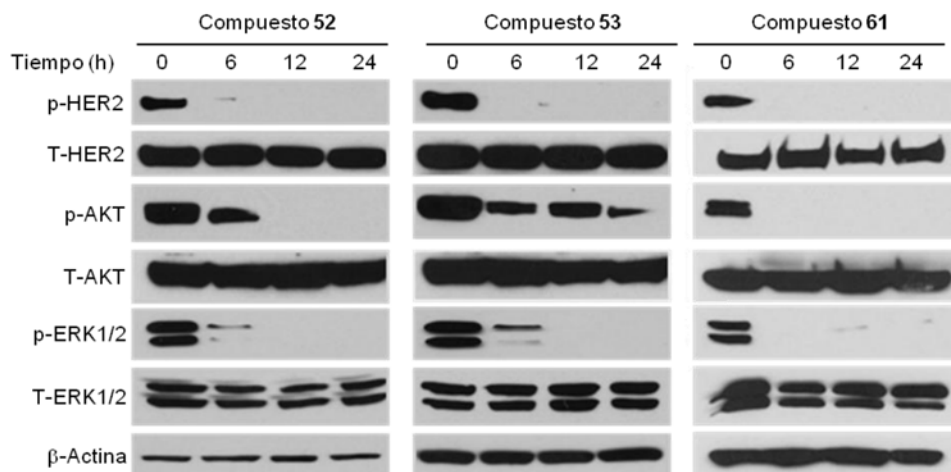


Figura 19. El tratamiento de células SK-Br3 con los compuestos **52**, **53** y **61** produce una disminución de la fosforilación de las proteínas HER2, AKT y ERK1/2. Se muestra la banda correspondiente a la β-actina como control de carga. Las imágenes mostradas son representativas de las obtenidas en al menos dos ensayos independientes.

Estudios previos indican que los inhibidores de FASN interfieren con el receptor HER2 y sus rutas de señalización.^{41,81} Por tanto, se determinó el efecto de los inhibidores **52**, **53** y **61** sobre la activación del receptor HER2 y sus vías de transducción de la señal, tales como las quinasas AKT y ERK (Figura 19).

El tratamiento de células SK-Br3 con los compuestos **52**, **53** y **61** produce un acentuado descenso de las formas fosforiladas (activas) de HER2 (p-HER2), de AKT (p-AKT) y de ERK1/2 (p-ERK1/2) de tal forma que tras 6 h de incubación con el compuesto, dichas formas fosforiladas prácticamente desaparecen en todos los

casos mientras que se mantienen invariables los niveles totales de dichas proteínas (Figura 19). Así, la inhibición de la actividad de FASN producida por los derivados **52**, **53** y **61** inactiva eficazmente el receptor HER2 y sus rutas de señalización intracelular.

3.3.4. Efecto sobre la enzima CPT-1 y pérdida de peso a corto plazo in vivo.

Una de las posibles interacciones secundarias de los inhibidores de FASN es la activación de la enzima CPT-1, lo que produce un aumento en la β -oxidación de ácidos grasos que en último término provoca una elevada pérdida de peso in vivo, efecto colateral indeseado en pacientes con tratamientos de quimioterapia. Por tanto, resulta fundamental estudiar los efectos de los inhibidores **52**, **53** y **61** en la enzima CPT-1. Los experimentos in vitro realizados indican que ninguno de estos compuestos produce una activación significativa de dicha enzima, de forma análoga al inhibidor natural EGCG y a diferencia del inhibidor sintético C75, estudiados en paralelo con fines comparativos (Figura 20).

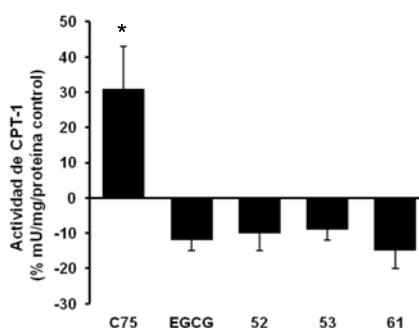


Figura 20. Efecto de los inhibidores de FASN C75, EGCG, **52**, **53** y **61** sobre la actividad catalítica de la enzima CPT-1. Los valores de actividad de CPT-1 fueron determinados a una concentración igual al valor de CI_{50} obtenido para la inhibición de la proliferación de células SK-Br3 y corresponden al valor medio \pm E.E. de un mínimo de dos experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0.01$.

Estos resultados in vitro fueron confirmados in vivo. Así, la administración intraperitoneal (i.p.) de una dosis de 30 mg/Kg de los compuestos **52**, **53** y **61** no indujo una pérdida de peso significativa tras 24 h ni alteraciones comportamentales, análogamente a lo que ocurre en el caso del polifenol natural EGCG. Por el contrario, la administración del compuesto C75 en las mismas condiciones experimentales induce una pérdida de peso superior al 20% (Figura 21), observándose también signos de sufrimiento y alteraciones comportamentales.

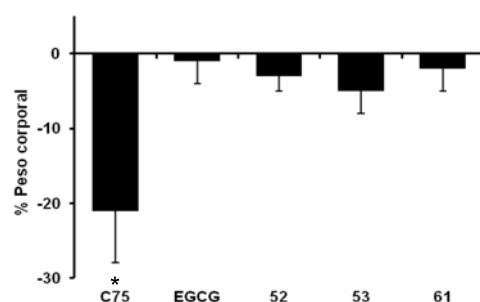


Figura 21. Variación del peso corporal en ratones tras la administración de los inhibidores de FASN C75, EGCG, **52**, **53** y **61** (30 mg/Kg, i.p.). Los datos fueron tomados 24 h post-administración y corresponden a los valores medios \pm E.E. (n = 4). * p < 0.01.

3.4. Estudio de la toxicidad y de las propiedades farmacológicas.

3.4.1. Toxicidad in vivo de los leads.

Teniendo en cuenta el prometedor perfil farmacológico de los nuevos derivados **52**, **53** y **61**, el paso siguiente previo a la realización de un estudio de la eficacia de los compuestos en un modelo animal tumoral fue el análisis de su toxicidad in vivo. Para ello, ratones sanos fueron tratados cada 24 h durante 15 días con diferentes dosis de los compuestos **52**, **53** y **61**. Diariamente se observó tanto el comportamiento como el peso de los ratones. Pasados 15 días desde el inicio del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y se analizaron diferentes muestras (hígado, riñón, corazón, pulmones, intestino, cerebro y sangre) con el fin de detectar posibles alteraciones. Los estudios de anatomía patológica de los órganos recogidos indicaron que ninguno de los tres compuestos, a ninguna de las dosis empleadas (25-75 mg/Kg), produjo alteración alguna con respecto al grupo control. Asimismo, tampoco se detectaron modificaciones en los perfiles hepático (Figura 22, niveles de alanino y aspartato aminotransferasas, ALT y AST respectivamente, así como de fosfatasa alcalina, ALP) o renal (Figura 23, niveles de urea y creatinina). Por tanto, la administración de los inhibidores **52**, **53** y **61** en dosis comprendidas entre 25 y 75 mg/Kg no produce toxicidad significativa, al menos en ratones sanos.

Resultados análogos se obtuvieron en el estudio hematológico (Figura 24). En general, los valores obtenidos para los ratones tratados con los nuevos inhibidores no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control. Sólo en el caso de la administración del derivado **52** a una dosis de 75 mg/Kg se observó una desviación de los valores del grupo control aunque

sin llegar a representar riesgo hematológico. Tampoco se observaron alteraciones en el comportamiento animal a lo largo de la duración del ensayo (15 días). Por último, el tratamiento de los ratones con los compuestos **52** y **61** no induce pérdidas significativas de peso hasta dosis de 75 mg/Kg (Figura 25), aunque el derivado **53** sí indujo una significativa pérdida de peso con respecto al grupo control a una dosis de 50 mg/Kg. Teniendo en cuenta que además se trata del *lead* con peores valores de CI_{50} en SK-Br3 e inhibición de FASN (29 μ M y 69%, respectivamente), y que bloquea de forma menos eficaz la ruta de señalización de HER2 (p-AKT, Figura 19), se decidió abandonar el desarrollo del compuesto **53** en este punto.

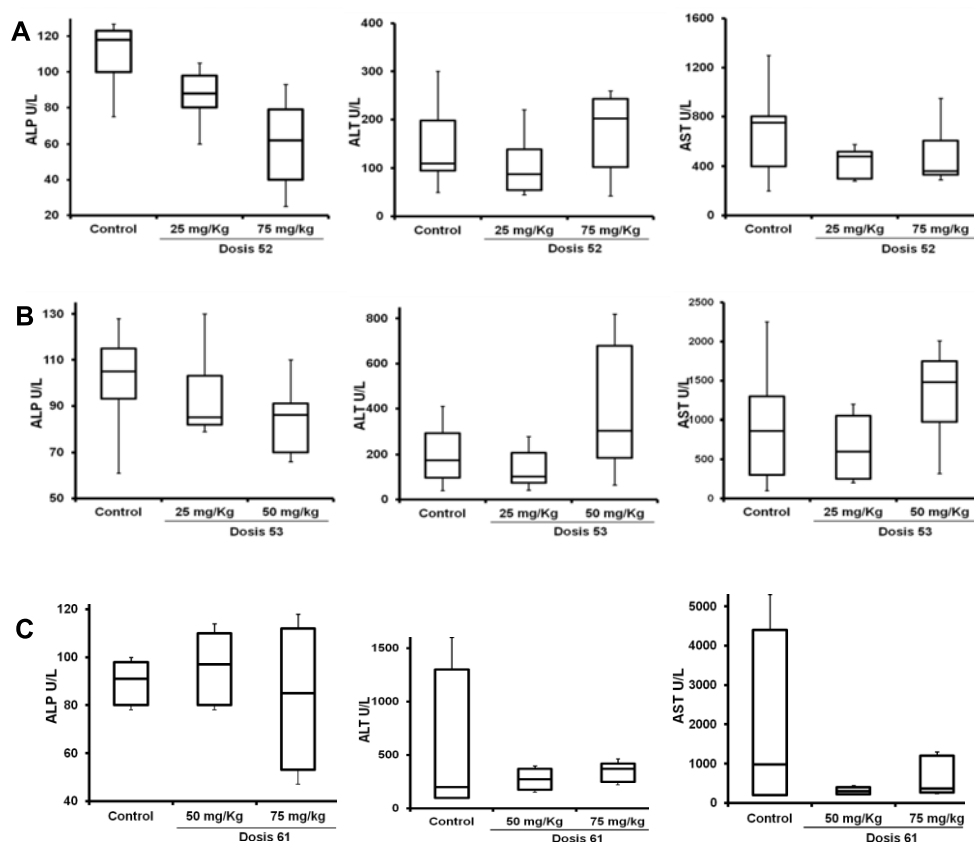


Figura 22. Perfil hepático de los compuestos **52** (A), **53** (B) y **61** (C).

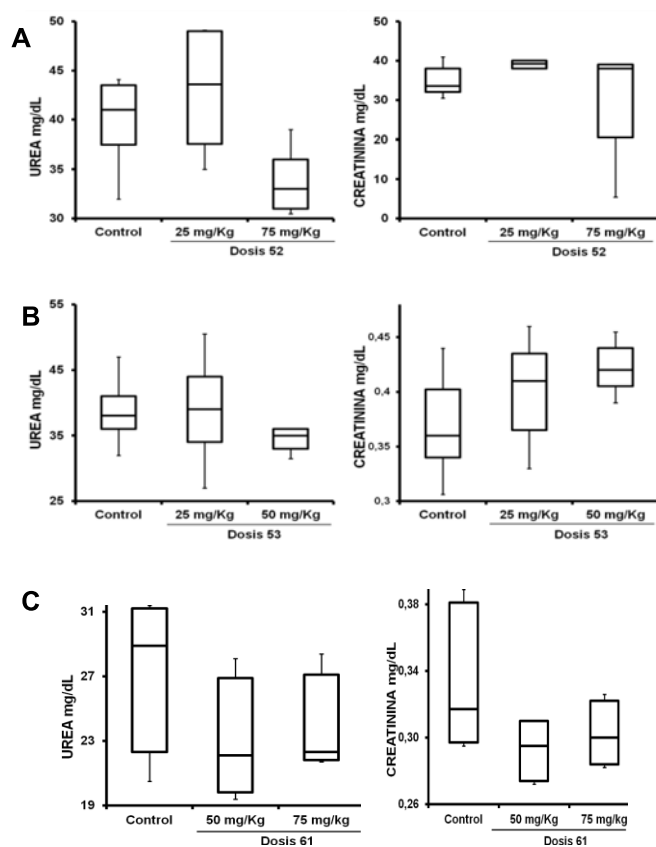


Figura 23. Perfil renal de los compuestos **52** (A), **53** (B), **61** (C).

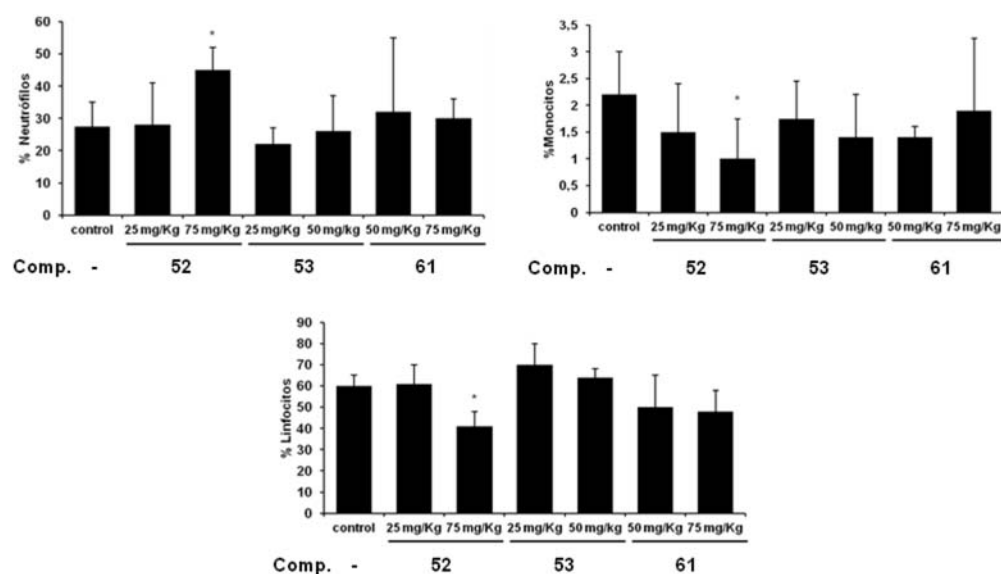


Figura 24. Estudio hematológico de los nuevos inhibidores **52**, **53** y **61**. * $p < 0.01$.

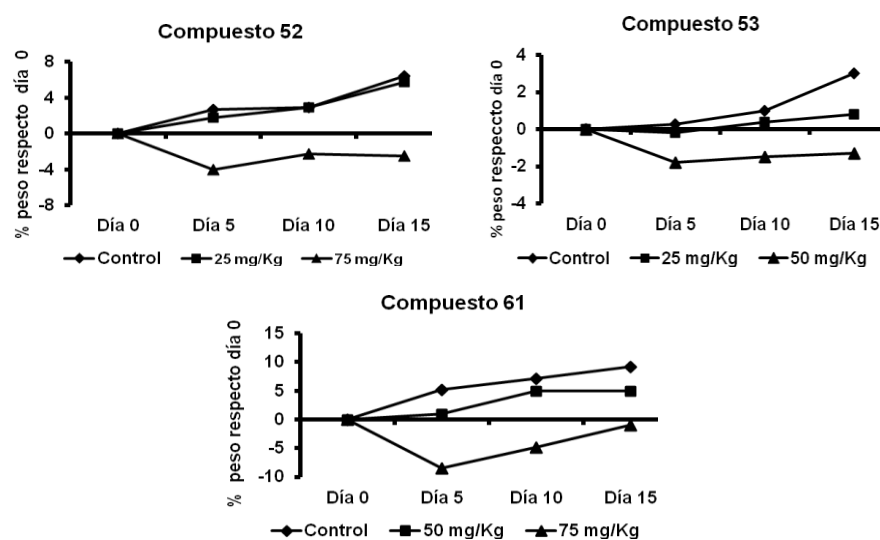


Figura 25. Variación del peso corporal de los ratones durante el estudio de toxicidad de los nuevos inhibidores de FASN **52**, **53** y **61**.

3.4.2. Estabilidad *in vitro*.

A continuación, y teniendo en cuenta que el principal inconveniente del inhibidor natural EGCG era su baja estabilidad, se determinó el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de los compuestos **52** y **61** tanto en suero de ratón como humano. Para ello, el suero seleccionado se incubó a 37 °C en presencia del compuesto objeto de estudio tomándose alícuotas a diferentes tiempos (entre 15 min y 4 h). La cantidad de compuesto presente se semicuantificó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS) integrando el pico correspondiente al compuesto de interés ($M-H^+$) y normalizando dicha área respecto al valor inicial a tiempo cero (100%). El $t_{1/2}$ del compuesto se determinó a partir del ajuste de la curva resultante a una ecuación de decaimiento exponencial.

El $t_{1/2}$ de los compuestos **52** y **61** (Tabla 9) puede considerarse como bueno en el caso del suero humano, estando próximo a las 2 h en el caso del compuesto **61**. Sin embargo, en el caso del suero de ratón, el $t_{1/2}$ es moderado, ya que no llega a la media hora. Con fines comparativos se estudió la estabilidad de EGCG, cuya presencia no fue detectable en las mismas condiciones desde los primeros minutos del análisis, lo que confirmó la extremadamente baja estabilidad de este inhibidor de FASN. Por lo tanto los compuestos **52** y **61** suponen una clara mejora de las propiedades farmacocinéticas *in vitro* con respecto al compuesto natural EGCG.

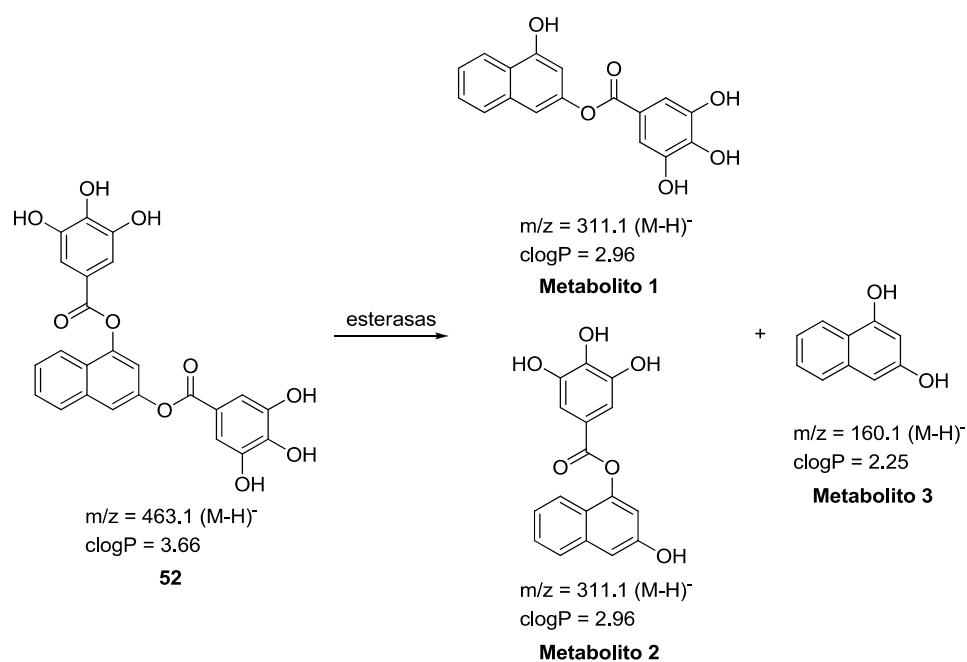
Tabla 9. Tiempo de vida media de los compuestos **52** y **61**

Compuesto	Suero	$t_{1/2}$ (h) ^a
52	Humano	1.4 ± 0.3
	Ratón	0.3 ± 0.1
61	Humano	1.9 ± 0.2
	Ratón	0.4 ± 0.2
EGCG	Humano	< 0.10
	Ratón	< 0.10

^aEl tiempo de vida media ($t_{1/2}$) corresponde al valor medio ± E.E. obtenido en un mínimo de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

3.4.3. Propiedades farmacocinéticas *in vivo*.

Previamente al estudio de la eficacia de los nuevos inhibidores de FASN en un modelo de cáncer *in vivo*, se determinaron los parámetros farmacocinéticos. Dichos estudios se iniciaron con el compuesto **52** ya que era el que se encontraba en una fase más avanzada en el momento de comenzar estos ensayos. Para ello, a ratones sanos se les administró una dosis de 75 mg/Kg por vía intravenosa del derivado **52**. Pasado un tiempo determinado (entre 15 min y 4 h) se extrajo la práctica totalidad de la sangre a través de una punción intracardiaca y la presencia del compuesto **52** fue analizada mediante HPLC-MS, detectándose tanto el pico molecular correspondiente al compuesto **52** ($M-H^-$) como el de los posibles metabolitos producidos por hidrólisis de los enlaces éster presentes en la estructura (Esquema 26). El área del pico correspondiente al compuesto de interés permitió calcular, a partir de una recta de calibrado previa, la concentración del compuesto **52** presente en el suero del ratón frente al tiempo (Figura 26). A partir de esta gráfica se pudieron obtener los principales parámetros farmacocinéticos recogidos en la Tabla 10, aplicando para ello el modelo de distribución-eliminación mono-compartmental.⁸²



Esquema 26. Posible metabolismo del compuesto **52**.

En conjunto, el análisis de estos parámetros indica que las propiedades farmacocinéticas son moderadas. Así, el volumen de distribución (V_D , definido como el volumen en el cual la cantidad administrada de fármaco necesitaría estar uniformemente distribuida para que en todos los órganos haya una concentración de éste igual a la que hay en el suero) es muy elevado ($4600 \text{ L} \cdot \text{Kg}^{-1}$), lo que indica que el compuesto es muy lipofílico y difunde rápidamente al tejido adiposo, donde queda atrapado. Por otra parte, la constante de eliminación del compuesto también es demasiado alta ($k_{el} = 1.60 \text{ h}^{-1}$) lo cual conlleva un $t_{1/2}$ que no llega a la media hora (0.43 h). Cabe destacar que este valor de $t_{1/2}$ obtenido in vivo es comparable al $t_{1/2}$ obtenido in vitro (0.3 h) lo que indica que la mayor contribución a la eliminación del derivado **52** es el metabolismo producido en el suero. Por último, el valor del aclaramiento del plasma (*clearance*, CL_0 , que indica el volumen de plasma del cual se elimina el compuesto por unidad de tiempo) es también muy alto, es decir, el compuesto se encuentra muy poco tiempo en el torrente sanguíneo.

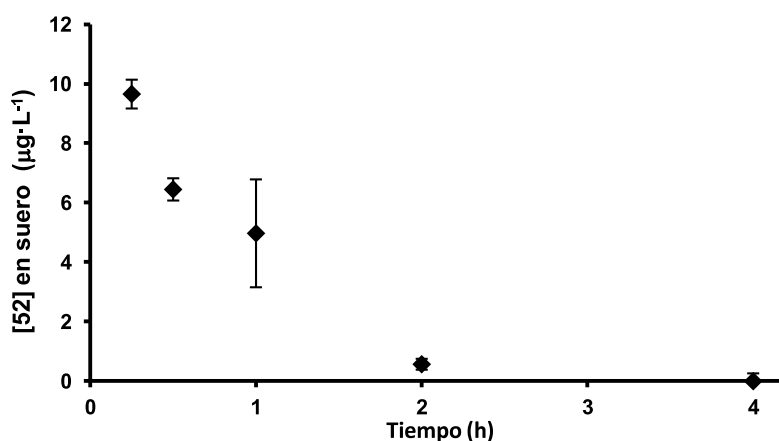


Figura 26. Estudio farmacocinético del derivado **52**.

A pesar de que la farmacocinética del compuesto **52** es mejorable, los parámetros son lo suficientemente razonables como para llevar a cabo un estudio de eficacia in vivo que permita, al menos como prueba de concepto, establecer si realmente la inhibición de la actividad de FASN es una estrategia terapéutica viable para el tratamiento del cáncer de mama.

Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos obtenidos para el compuesto **52**

Parámetro	Valor
Dosis (D)	75 mg·Kg ⁻¹
Concentración inicial (C ₀) ^a	16.3 µg·L ⁻¹
V _D (= D/C ₀)	4600 L·Kg ⁻¹
k _{el} ^a	1.60 h ⁻¹
t _{1/2} (= ln 2/k _{el})	0.43 h
AUC ^b (= C ₀ /k _{el})	0.434 mg·h·Kg ⁻¹
CL ₀ (= V _D ·k _{el})	7348 L·Kg ⁻¹ ·h ⁻¹

^aParámetros obtenidos a partir del ajuste lineal: $\ln([52]) = \ln(C_0) - k_{el} \cdot t$. ^bÁrea bajo la curva (area under the curve).

3.5. Determinación de la eficacia antitumoral.

La eficacia del inhibidor **52** se estudió en dos modelos de cáncer de mama, uno de ellos in vivo (modelo de xenoinjerto) y otro in vitro, en líneas tumorales resistentes a tratamientos de quimioterapia.

3.5.1. Modelo in vivo.

Para el estudio de eficacia in vivo se empleó un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama en el cual a ratones hembra atímicos se les implantaron células tumorales BT474. Una vez los tumores adquirieron el tamaño óptimo se inició el tratamiento con el compuesto (40 mg/Kg/día, i.p.) durante 45 días. Durante este periodo se determinó semanalmente la variación en el tamaño del tumor y el peso de los animales de los dos grupos experimentales. Los datos obtenidos indican que el compuesto **52** (Figura 27A) es capaz de frenar el crecimiento tumoral; incluso uno de los animales tratados con el derivado **52** no tuvo un tumor detectable al final del tratamiento. Asimismo, la administración del nuevo inhibidor no indujo pérdida de peso a los ratones en el plazo de tiempo que duró el tratamiento (Figura 27B). Por último, el estudio histológico del hígado, corazón, pulmón, riñón y cerebro de los animales tratados no mostró signos de toxicidad.

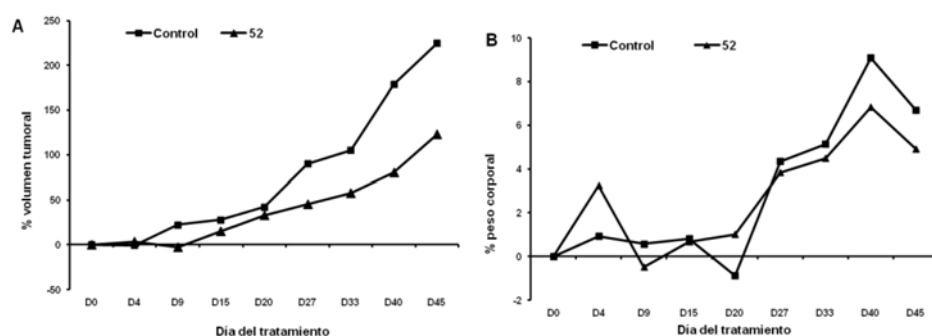


Figura 27. Variación del volumen tumoral (A) y del peso corporal (B) en los diferentes grupos experimentales (n=6) de los ratones.

Aunque estos resultados deben considerarse como preliminares, ya que se han obtenido en una población reducida de ratones, sí justifican plenamente el interés de estos compuestos como agentes antitumorales.

3.5.2. Modelos celulares: resistencia a agentes quimioterapéuticos en uso.

Entre el 20% y el 30% de los cánceres de mama poseen una sobreexpresión del receptor HER2, lo cual está asociado a una progresión y evolución desfavorable en el desarrollo de dicho cáncer.⁸³ Así, trastuzumab (comercializado por Roche como Herceptin®) es un anticuerpo monoclonal aprobado para el tratamiento de cáncer de mama metastásico HER2 positivo. Aunque el uso de este anticuerpo mejora sensiblemente los índices de recuperación, presenta la desventaja de que a lo largo del primer año la gran mayoría de los pacientes acaba desarrollando resistencia a dicho tratamiento.⁸⁴ Por otro lado, otro de los fármacos más empleados en pacientes que responden bien a trastuzumab y presentan niveles altos de los receptores HER2 y EGFR es el compuesto sintético lapatinib (comercializado por GlaxoSmithKline en Europa como Tyverb®). Este fármaco es un inhibidor de tirosina quinasa que interrumpe la señalización intracelular de los receptores EGFR y HER2, pero análogamente a lo que ocurre con trastuzumab las células tumorales acaban desarrollando resistencia al tratamiento con lapatinib.⁸⁴ Por tanto, resulta fundamental identificar compuestos que mantengan su capacidad citotóxica en células tumorales que han desarrollado resistencia a fármacos antitumorales habitualmente empleados como son trastuzumab y lapatinib.

Así, se extendió el estudio de inhibición de la proliferación celular del compuesto **52** a modelos celulares con una elevada expresión de HER2 (línea

tumoral de mama AU565), sometidas durante seis meses a presión de selección en presencia de trastuzumab o lapatinib, con el fin de obtener células AU565 resistentes a trastuzumab (AU565TR) o lapatinib (AU565LR), respectivamente. Una vez demostrado que tanto las líneas resistentes como la línea original poseen similares niveles de expresión de FASN (Figura 28), se determinó la capacidad citotóxica del compuesto **52** en las líneas celulares resistentes AU565TR y AU565LR y se comparó con células AU565 control (Tabla 11).

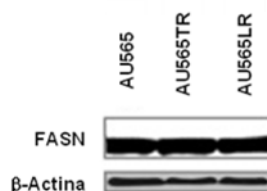


Figura 28. Expresión de FASN en células tumorales de mama (AU565), resistentes a trastuzumab (AU565TR) y a lapatinib (AU565LR). Se muestra la banda correspondiente a la β -actina como control de carga.

Tabla 11. Citotoxicidad de **52**, trastuzumab y lapatinib en las líneas celulares resistentes AU565TR y AU565LR y en la línea control AU565

Comp.	CI_{30} (μM) ^a		
	AU565	AU565TR	AU565LR
52	22 \pm 7	24 \pm 8	17 \pm 2
Trastuzumab	2.0 \pm 0.2	> 50	N.D. ^b
Lapatinib	1.6 \pm 0.3	N.D. ^b	14 \pm 2

^aLos valores de CI_{30} corresponden al valor medio \pm E.E. obtenidos en un mínimo de dos experimentos independientes realizados por triplicado. ^bN.D.: No determinado.

Como era de esperar, tanto trastuzumab como lapatinib han perdido capacidad para inhibir la proliferación celular en las líneas resistentes. Así, trastuzumab tiene un valor de CI_{30} de 2 μM en la línea original AU565, perdiendo por completo la citotoxicidad en la línea AU565TR (CI_{30} > 50 μM). En el caso de lapatinib, éste aumenta un orden de magnitud su CI_{30} en la línea resistente AU565LR (CI_{30} = 14 μM) con respecto a la línea tumoral original AU565 (CI_{30} = 1.6 μM). Por el contrario, el compuesto **52** mantiene su capacidad para inhibir el crecimiento de las células tumorales AU565 en todos los casos, con valores de

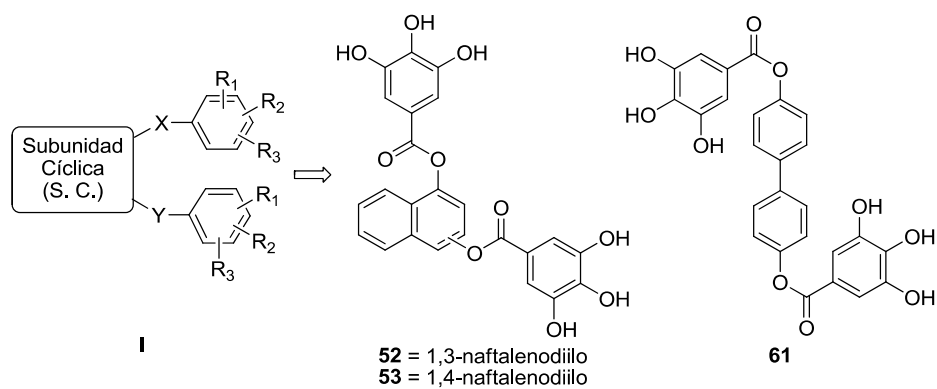
CI₃₀ similares en los tres tipos celulares: CI₃₀ (AU565) = 22 µM, CI₃₀ (AU565TR) = 24 µM y CI₃₀ (AU565LR) = 17 µM.⁸⁵

Estos prometedores resultados ponen de manifiesto que la inhibición de la actividad de FASN podría suponer una nueva estrategia terapéutica en el tratamiento del cáncer de mama que ha desarrollado resistencia a las terapias anti-HER2 en uso.

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

1. En este trabajo se han identificado nuevos inhibidores de la enzima FASN citotóxicos en células tumorales de mama. En el proceso *hit to lead* se han optimizado los elementos estructurales presentes en los compuestos de fórmula **I**, proceso que ha permitido seleccionar como *leads* los derivados **52**, **53** y **61**.
2. Los *leads* seleccionados inducen apoptosis en un amplio panel de líneas tumorales, siendo la inhibición de FASN el principal mecanismo implicado en la muerte celular. Asimismo, los nuevos compuestos bloquean eficazmente la activación del receptor HER2 y de sus rutas de señalización intracelular. Por último, se ha confirmado que estos inhibidores no activan la enzima CPT-1, no son tóxicos y tampoco inducen pérdida de peso in vivo.
3. En cuanto a sus propiedades farmacocinéticas, los derivados **52** y **61** presentan una estabilidad en suero in vitro superior a la del polifenol natural EGCG. Además, el compuesto **52** ha mostrado unos parámetros farmacocinéticos in vivo suficientemente razonables para llevar a cabo estudios de eficacia.
4. El compuesto **52** es eficaz tanto in vivo, siendo capaz de frenar el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama, como in vitro, en modelos celulares de resistencia a terapias anti-HER2.



En conjunto todos estos datos confirman que la inhibición de la enzima FASN mediante compuestos como **52** puede representar una nueva estrategia para el tratamiento del cáncer de mama que ha desarrollado resistencia a las terapias anti-HER2 actualmente en uso.

PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Química.

Todos los productos de partida, reactivos y disolventes se han adquirido con alto grado de pureza en Sigma-Aldrich, Fluka, ABCR, Panreac y Biotage. La TEA se secó sobre hidruro cálcico y se destiló antes de su utilización. El DCM y el THF anhidros se utilizaron recién destilados sobre NaH y Na, respectivamente.

Las reacciones de hidrogenación se han realizado en un hidrogenador "Parr". La cromatografía en capa fina (c.c.f.) se ha llevado a cabo en cromatofolios de gel de sílice de Merck (Kieselgel 60F-254) y detección con luz UV o disolución etanólica al 10% de ácido fosfomolibdico. La cromatografía en columna se ha llevado a cabo utilizando gel de sílice tipo 60 de Merck (tamaño de grano 290-400 ASTM) o en un equipo de cromatografía flash Varian 971-FP con cartuchos de gel de sílice Super Flash Si50.

Los puntos de fusión (p.f.) se han determinado en un aparato Stuart-Scientific y no se han corregido. Los espectros de IR se han registrado en un espectrofotómetro "Perkin-Elmer 781" o en un espectrofotómetro "Bruker Tensor 27" equipado con un accesorio ATR Specac con cristal de diamante para la medida de la reflectancia total atenuada y las frecuencias se expresan en cm^{-1} . Los espectros de ^1H - y ^{13}C -RMN se han obtenido en el Centro de Asistencia a la Investigación (CAI) de RMN de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y se han registrado a temperatura ambiente en un espectrómetro "Bruker Avance 300-AM" (^1H , 300 MHz; ^{13}C , 75 MHz) o en un espectrómetro "Bruker 200-AC" (^1H , 200 MHz; ^{13}C , 50 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) utilizando tetrametilsilano como referencia interna, y las constantes

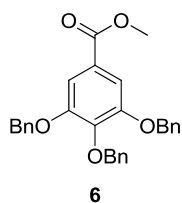
de acoplamiento (J) se expresan en hertzios (Hz). En la descripción de las señales de RMN se han empleado las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (triplete), m (multiplete) y a (ancho). Para facilitar la comprensión de la asignación de las señales de protón y de carbono de los compuestos, se ha utilizado la abreviatura “gal” y “naft” para hacer referencia a las señales correspondientes a los radicales 3,4,5-trihidroxifenilo y naftilo.

El análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS) se ha llevado a cabo en un espectrómetro Agilent 1200LC-MSD VL. La separación se ha realizado con una columna Eclipse XDB-C18 (5 μ m, 4.6 mm x 12.5 mm) y la fase móvil empleada consiste en un gradiente de A (agua:metanol 95:5) y B (agua:metanol 5:95) con un 0.1% de hidróxido amónico y 0.1% de ácido fórmico como aditivos. Los espectros de masas se han llevado a cabo utilizando la técnica electrospray (ESI). Para todos los compuestos ensayados se confirmó una pureza de al menos el 95% mediante HPLC-MS y sus tiempos de retención se proporcionan en el anexo.

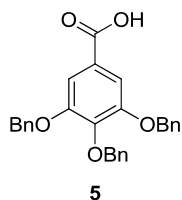
5.1.1. Síntesis de los compuestos finales 1-4.

5.1.1.1. Síntesis del ácido 3,4,5-tris(benciloxi)benzoico (5).

3,4,5-Tris(benciloxi)benzoato de metilo (6). Se disuelven 3.00 g (16 mmol, 1 equivalente) de 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo y 6.3 mL (65 mmol, 4.1 equivalentes) de cloruro de bencilo en 25 mL de DMF. Tras unos minutos de agitación, se adicionan 8.10 g (58 mmol, 3.6 equivalentes) de K_2CO_3 y la mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 3 h. A continuación, se añaden 40 mL de agua y se enfría en baño de hielo, precipitando un sólido que se aísla por filtración a vacío y se lava con agua fría. Tras secar a vacío se obtienen 7.27 g (98%) de **10**. p.f. 87-88 °C (hexano/tolueno) (lit.⁶¹ p.f. 87 °C); IR ν 1718 (C=O), 1595 (Ar), 1124 (C-O); 1H -RMN (200 MHz, $CDCl_3$) δ 3.81 (s, 3H, CH_3), 5.10 (s, 6H, $3CH_2$), 7.20-7.60 (m, 17H, Bn, gal); ^{13}C -RMN (50 MHz, $CDCl_3$) δ 52.6 (CH_3), 71.6 ($2CH_2$ meta), 75.5 (CH_2 para), 109.4 (2CH gal), 125.6 (C gal), 127.9, 128.3, 128.5, 128.6, 128.9, 129.4 (15CH Bn), 137.0, 137.8 (3C Bn), 142.7, 153.0 (3C gal), 167.0 (C=O).



Ácido 3,4,5-tris(benciloxi)benzoico (5). Se disuelven 4.74 g (10 mmol, 1 equivalente) de 3,4,5-tris(benciloxi)benzoato de metilo (**6**) en una disolución de 1.25 g (40 mmol, 4 equivalentes) de NaOH en 90 mL de metanol. Se añaden 4.5 mL de agua y la reacción se calienta a reflujo durante 1.5 h. A continuación, se adicionan 87 mL de agua y la mezcla se acidifica con HCl concentrado, precipitando un sólido blanco que se aísla por filtración a vacío, obteniéndose 4.15 g (97%) de **5**. p.f. 196-197 °C (etanol) (lit.⁶¹ 186 °C); IR ν 1686 (C=O), 1595 (Ar), 1128 (C-O); ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) δ 5.09 (s, 6H, 3CH₂), 7.17-7.35 (m, 17H, Bn, gal); ¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃) δ 71.4 (2CH₂ *meta*), 75.3 (CH₂ *para*), 109.7 (2CH gal), 124.1 (C gal), 127.6, 128.0, 128.1, 128.2, 128.5, 128.6 (15CH Bn), 136.5, 137.3 (3C Bn), 141.8 (C gal), 152.6 (2C gal), 170.9 (C=O).

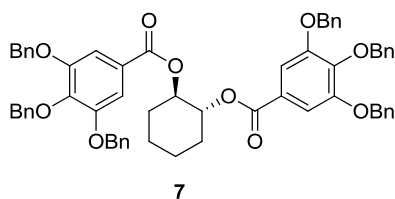


5.1.1.2. Síntesis de los diésteres intermedios **7-10**.

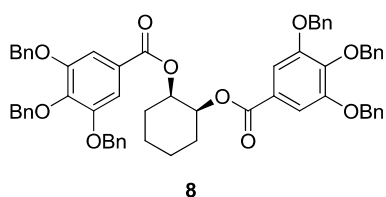
Procedimiento general. Una disolución del ácido 3,4,5-tris(benciloxi)benzoico (**5**) (2.2 equivalentes), DCC (2.2 equivalentes) y DMAP (0.2 equivalentes) en 5 mL/mmol de THF anhidro se agita, bajo atmósfera de argón, durante 15 min a temperatura ambiente, seguidos de otros 15 min a 0 °C. A continuación, se añade el diol comercial correspondiente (1 equivalente) disuelto en 3 mL/mmol de THF anhidro y la reacción se agita durante 2 h en baño de hielo. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, la reacción se agita durante toda la noche. La mezcla se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se redisuelve en DCM y se lava con NaHCO₃ acuoso al 5%. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, el disolvente se evapora y el residuo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando el eluyente adecuado, obteniéndose el

derivado bencilado correspondiente **7-10**, que se cristaliza de una mezcla de DCM/hexano.

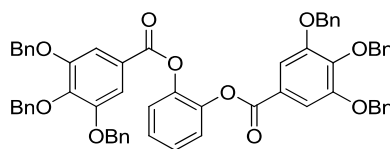
(±)-trans-1,2-Bis([3,4,5-tris(benciloxi)benzoil]oxi)ciclohexano (7). Se obtuvo a partir de una disolución de 1.20 g del ácido **5** y 144 mg de (±)-trans-1,2-ciclohexanodiol. Cromatografía: DCM (R_f 0.54). Rto: 50%; p.f. 111-113 °C; IR ν 1713 (C=O), 1589 (Ar), 1500 (Ar), 1115 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 1.50-1.55 (m, 4H, 2CH_2 ciclohexano), 1.80 (m, 2H, CH_2 ciclohexano), 2.20 (m, 2H, CH_2 ciclohexano), 4.98 (s, 8H, 4CH_2 meta), 5.01 (s, 4H, 2CH_2 para), 5.12-5.14 (m, 2H, 2CH ciclohexano), 7.16-7.38 (m, 34H, Bn, gal); $^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 23.4, 30.2 (4CH_2 ciclohexano), 71.0 (4CH_2 meta), 74.7 (2CH ciclohexano), 75.0 (2CH_2 para), 108.9 (4CH gal), 125.1 (2C gal), 127.4, 127.7, 127.8, 128.0, 128.3 (30CH Bn), 136.5, 137.3 (6C Bn), 142.5 (2C gal), 152.4 (4C gal), 165.6 (2C=O); ESI-MS 983.4 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.



cis-1,2-Bis([3,4,5-tris(benciloxi)benzoil]oxi)ciclohexano (8). Se obtuvo a partir de una disolución de 1.20 g del ácido **5** y 144 mg de cis-1,2-ciclohexanodiol. Cromatografía: DCM (R_f 0.51). Rto: 64%; p.f. 136-138 °C; IR ν 1709 (C=O), 1589 (Ar), 1500 (Ar), 1114 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 1.48-1.78 (m, 8H, 4CH_2 ciclohexano), 4.84 (s, 4H, 2CH_2), 4.86 (s, 4H, 2CH_2), 4.91 (s, 4H, 2CH_2), 5.20-5.23 (m, 2H, CH ciclohexano), 6.80-7.29 (m, 34H, Bn, gal); $^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 21.7, 28.3 (4CH_2 ciclohexano), 70.9 (4CH_2 meta), 71.7 (2CH ciclohexano), 74.9 (2CH_2 para), 109.2 (4CH gal), 125.5 (2C gal), 127.7, 128.0, 128.1, 128.3, 128.5, 128.6 (30CH Bn), 136.7, 137.6 (6C Bn), 142.6 (2C gal), 152.6 (4C gal), 165.4 (2C=O); ESI-MS 983.4 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.

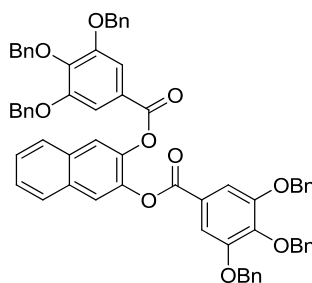


1,2-Bis([3,4,5-tris(benciloxi)benzoil]oxi)benceno (9). Se obtuvo a partir de una disolución de 1.00 g del ácido **5** y 114 mg de catecol. Cromatografía: DCM/hexano 7:3 (R_f 0.11). Rto: 37%; p.f. 126-127 °C; IR ν 1743 (C=O), 1587 (Ar), 1499 (Ar), 1121 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 4.84 (s, 8H, 4CH₂ *meta*), 4.92 (s, 4H, 2CH₂ *para*), 7.07-7.36 (m, 34H, Bn, Ph), 7.41 (s, 4H, gal); $^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 71.3 (4CH₂ *meta*), 75.2 (2CH₂ *para*), 109.7 (4CH gal), 123.7 (2C gal), 123.9, 126.8, 127.7, 127.9, 128.1, 128.2, 128.4, 128.6 (30CH Bn, 4CH Ph), 136.5, 137.5 (6C Bn), 142.7, 143.4 (2C gal, 2C Ph), 152.8 (4C gal), 164.0 (2C=O); ESI-MS 977.2 (M + Na)⁺.



9

2,3-Bis([3,4,5-tris(benciloxi)benzoil]oxi)naftaleno (10). Se obtuvo a partir de una disolución de 1.00 g del ácido **5** y 160 mg de 2,3-dihidroxinaftaleno. Cromatografía: DCM/hexano 6:4 (R_f 0.1). Rto: 37%; p.f. 130-131 °C; IR ν 1740 (C=O), 1589 (Ar), 1500 (Ar), 1194 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 4.83 (s, 8H, 4CH₂ *meta*), 4.91 (s, 4H, 2CH₂ *para*), 7.05-7.28 (m, 30H, Bn), 7.38 (s, 4H, gal), 7.44-7.49 (m, 2H, naft), 7.78-7.83 (m, 4H, naft); $^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 71.2 (4CH₂ *meta*), 75.1 (2CH₂ *para*), 109.5 (4CH gal), 121.2 (2CH naft), 123.7 (2C gal), 126.5, 127.6, 127.9, 128.1, 128.2, 128.3, 128.5 (30CH Bn, 4CH naft), 131.7 (2C naft), 136.3, 137.4 (6C Bn), 141.4, 143.3, 152.7 (6C gal, 2C naft), 164.2 (2C=O); ESI-MS 1027.3 (M + Na)⁺.

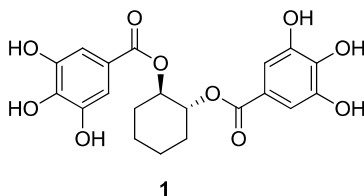


10

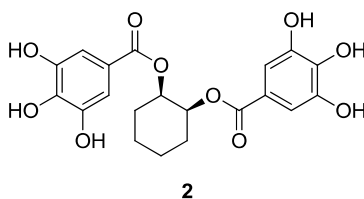
5.1.1.3. Síntesis de los diésteres finales **1-4**.

Procedimiento general. A una disolución del correspondiente compuesto bencilado **7-10** en una mezcla de DCM/etanol (270 mL/mmol) se le añade Pd(OH)₂ sobre carbono (980 mg/mmol) y la mezcla se hidrogena a temperatura ambiente, con una presión inicial de 50 psi (*pounds per square inch*, libra por pulgada cuadrada) hasta la completa desaparición del producto de partida (c.c.f., 3-5 h). A continuación, el catalizador se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose un sólido que se purifica por recristalización de una mezcla de DCM/metanol 3:1.

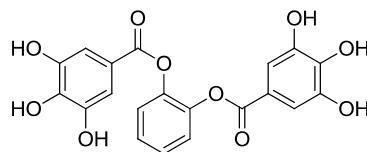
(±)-trans-1,2-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]ciclohexano (1). Se obtuvo a partir de 600 mg de **7**. Rto: 75%; p.f. 80-82 °C; IR ν 3382 (OH), 1697 (C=O), 1616 (Ar), 1230 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 1.50-1.62 (m, 4H, ciclohexano), 1.76-1.83 (m, 2H, ciclohexano), 2.15-2.19 (m, 2H, ciclohexano), 5.06-5.09 (m, 2H, ciclohexano), 7.00 (s, 4H, gal); ¹³C-RMN (50 MHz, CD₃OD) δ 24.2, 30.9 (4CH₂ ciclohexano), 74.9 (2CH ciclohexano), 110.0 (4CH gal), 121.4 (2C gal), 139.7, 146.3 (6C gal), 167.7 (2C=O); ESI-MS 418.9 (M – H)⁻.



cis-1,2-Bis[(3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxy]cyclohexane (2). Se obtuvo a partir de 600 mg de **8**. Rto: 70%; p.f. 84-86°C; IR ν 3382 (OH), 1697 (C=O), 1616 (Ar), 1230 (C-O); ¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) δ 1.54-1.65 (m, 2H, ciclohexano), 1.74-1.85 (m, 4H, ciclohexano), 1.98-2.07 (m, 2H, ciclohexano), 5.23-5.27 (m, 2H, ciclohexano), 7.03 (s, 4H, gal); ¹³C-RMN (50 MHz, CD₃OD) δ 23.0, 29.0 (4CH₂ ciclohexano), 72.9 (2CH ciclohexano), 110.2 (4CH gal), 121.8 (2C gal), 139.8, 146.4 (6C gal), 167.7 (2C=O); ESI-MS 418.9 (M – H)⁻.

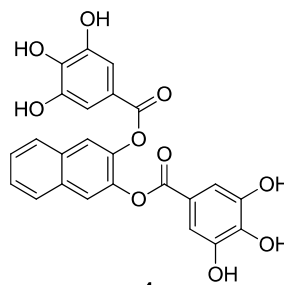


1,2-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]benceno (3). Se obtuvo a partir de 300 mg de **9**. Rto: 60%; p.f. 210 °C; IR ν (KBr) 3427 (OH), 1689 (C=O), 1624 (Ar), 1228 (C-O); ^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 7.08 (s, 4H, gal), 7.29-7.37 (m, 4H, Ph); ^{13}C -RMN (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 109.1 (4CH gal), 118.1 (2C gal), 123.2, 126.0 (4CH Ph), 142.0, 145.0 (2C Ph, 6C gal), 163.5 (2C=O); ESI-MS 412.9 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.



3

2,3-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]naftaleno (4). Se obtuvo a partir de 300 mg de **10**. Rto: 60%; p.f. 182-183 °C; IR ν 3308 (OH), 1743 (C=O), 1618 (Ar), 1194 (C-O); ^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 7.12 (s, 4H, gal), 7.51-7.56 (m, 2H, naft), 7.79 (s, 2H, naft), 7.89-7.92 (m, 2H, naft); ^{13}C -RMN (50 MHz, CD_3OD) δ 109.3 (4CH gal), 118.4 (2C gal), 120.6, 125.9, 126.9 (6CH naft), 131.7 (2C naft), 139.2 (2C gal), 141.9 (2C naft), 145.1 (4C gal), 165.0 (2C=O); ESI-MS 487.0 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.



4

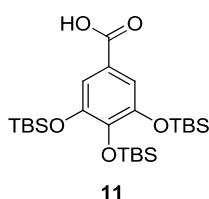
5.1.2. Síntesis de los compuestos finales **40-61**, **91-94** y **110-118**.

5.1.2.1. Síntesis de los ácidos protegidos de partida **11**, **85** y **86**.

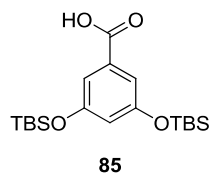
Procedimiento general. Se disuelven 1 equivalente del ácido comercial correspondiente, 2.4 equivalentes de imidazol/grupo OH del ácido y 1.4 equivalentes de TBSCl/grupo OH del ácido en DMF anhidra (3.4 mL/mmol de ácido). La reacción se mantiene bajo atmósfera de argón y con agitación magnética durante toda la noche. A continuación se adiciona H_3PO_4 1 M y el crudo se extrae con hexano. La fase orgánica se lava consecutivamente con disoluciones saturadas de NaHCO_3 y NaCl , se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y el

disolvente se elimina a presión reducida. El aceite resultante se trata con agua (3 mL/mmol de ácido), ácido acético (9 mL/mmol de ácido) y THF (6 mL/mmol de ácido) durante 3 h, se extrae con DCM y los extractos orgánicos se lavan consecutivamente con agua, NaHCO₃ saturado y NaCl saturado, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. El aceite obtenido (**11**, **85**, **86**) se purifica por cromatografía en columna utilizando DCM como eluyente.

Ácido 3,4,5-tris[[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi]benzoico (11**).** Se obtuvo a partir de una disolución de 3.0 g de ácido gálico. Rto: 84%; p.f. 238-240 °C (lit.⁶⁴ p.f. 223-224 °C); IR ν 3461 (OH), 1697 (C=O), 1575 (Ar), 1078 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.17 (s, 6H, Me₂SiO *para*), 0.27 (s, 12H, Me₂SiO *meta*), 0.97 (s, 18H, *t*-BuSiO *meta*), 1.02 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 7.31 (s, 2H); ¹³C-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ -3.8 (2CH₃ Me₂SiO *para*), -3.5 (4CH₃ Me₂SiO *meta*), 17.8, 18.0 (3C *t*-BuSiO), 26.2 (9CH₃ *t*-BuSiO), 116.2 (2CH), 121.2 (C), 144.2 (C), 148.6 (2C), 172.2 (C=O).

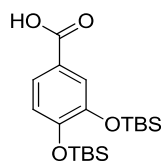


Ácido 3,5-bis[[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi]benzoico (85**).** Se obtuvo a partir de una disolución de 2.1 g de ácido α -resorcílico. Rto: 76%; p.f. 188-192 °C; IR ν 1692 (C=O), 1593 (Ar), 1171 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.25 (s, 12H, Me₂SiO), 1.01 (s, 18H, *t*-BuSiO), 6.63 (t, *J* = 2.3, 1H), 7.17 (d, *J* = 2.3, 2H); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ -4.3 (4CH₃ Me₂SiO), 18.8 (2C *t*-BuSiO), 25.9 (6CH₃ *t*-BuSiO), 115.4 (2CH), 117.4 (CH), 133.4 (C), 157.5 (2C), 167.1 (C=O).



Ácido 3,4-bis[[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi]benzoico (86**).** Se obtuvo a partir de una disolución de 4.0 g de ácido protocatecuico. Rto: 81%; p.f. 154-157 °C; IR ν 1690 (C=O), 1598 (Ar); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.23 (s, 6H, Me₂SiO), 0.24 (s, 6H, Me₂SiO), 0.99 (s, 9H, *t*-BuSiO), 1.00 (s, 9H, *t*-BuSiO), 6.87 (d, *J* = 8.3, 1H), 7.57 (d, *J* = 2.0, 1H), 7.61 (dd, *J* = 8.3, 2.2, 1H); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ -4.12,

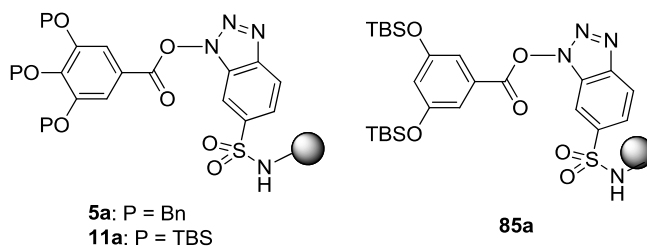
-4.03 (4CH₃ Me₂SiO), 18.5 (2C *t*-BuSiO), 25.9 (6CH₃ *t*-BuSiO), 120.6, 122.5 (2CH), 122.8 (C), 124.5 (CH), 146.8, 152.5 (2C), 172.0 (C=O).



86

5.1.2.2. Síntesis de los ácidos activados unidos a la resina **5a**, **11a** y **85a**.

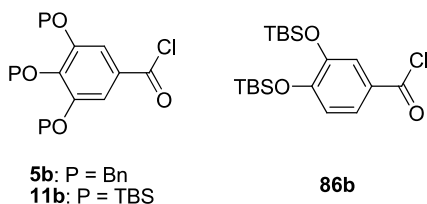
La reacción entre la resina PS-HOBt y los ácidos **5**, **11** y **85** se realizó siguiendo las condiciones óptimas descritas previamente en la bibliografía.⁶⁵ En un matraz se dispone la resina de PS-HOBt (1.0 mmol/g de capacidad de carga, 1 equivalente) se añade por este orden, una disolución 0.045 M de DMAP en DCM (0.6 equivalentes), una disolución 0.38 M del ácido correspondiente en DMF (1.5 equivalentes) y, por último, una disolución 1.65 M de DIC en DCM (4.4 equivalentes). La reacción transcurre con agitación magnética a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 3 h. Pasado este tiempo el sólido se filtra y se lava con DMF, DCM, otra vez con DMF y por último con THF, obteniéndose de forma cuantitativa **5a**, **11a** y **85**, respectivamente, en forma de sólidos que se secan en bomba de alto vacío.



5.1.2.3. Síntesis de los cloruros de ácido **5b**, **11b** y **86b**.

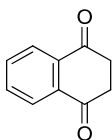
Los cloruros de ácido de **5b**,⁸⁶ **11b** y **86b** se prepararon siguiendo las condiciones descritas en la bibliografía. A una disolución del ácido protegido correspondiente (1 equivalente) en tolueno anhidro (1 mL/mmol de ácido) en presencia de cantidades catalíticas de DMF se añaden gota a gota 1.5 equivalentes de cloruro de oxalilo. La reacción se mantiene a 50 °C con agitación magnética y salida de gases durante 1.5 h. Pasado este tiempo el crudo de reacción se decanta y el matraz se lava con pequeñas porciones de tolueno

anhidro. Se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose de forma cuantitativa **5b**, **11b** y **86b** en forma de sólidos, que pueden ser usados sin necesidad de purificación posterior.



5.1.2.4. Síntesis de los dioles no comerciales **14-18**.

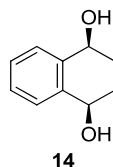
2,3-Dihidro-1,4-naftoquinona (19). Una suspensión de 2.00 g de 1,4-dihidroxinaftaleno (1 equivalente, 12.5 mmol) en 40 mL de ácido trifluoroacético se agita a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón hasta obtener una disolución transparente (30 min). Pasado este tiempo se añaden 160 mL de tolueno y se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose un sólido que se purifica por recristalización en diisopropiléter obteniéndose 2,3-dihidro-1,4-naftoquinona como un sólido. Rto: 62%. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.⁶⁶ $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 3.08 (s, 4H, 2CH_2), 7.72-7.75 (m, 2H, Ar), 8.02-8.06 (m, 2H, Ar).



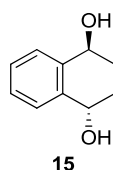
19

cis-1,2,3,4-Tetrahidronaftaleno-1,4-diol (14). A una disolución de L-Selectride® (1 M en THF, 12 mL, 3 equivalentes) a $-50\text{ }^\circ\text{C}$ bajo atmósfera de argón y agitación magnética se le añade gota a gota una disolución de 640 mg de **19** (4.0 mmol, 1 equivalente) en 4.8 mL de 1,2-dimetoxietano. Pasadas 3 h se deja que la reacción alcance la temperatura ambiente y se mantiene la agitación hasta que se observa la desaparición del producto de partida por c.c.f. (1.5 h). La reacción se detiene mediante la adición de una mezcla de 2.7 mL de una disolución 3 M de NaOH con 1.7 mL de H_2O_2 al 30%. Después de 30 min de agitación, la mezcla de reacción se extrae con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se juntan y se secan sobre Na_2SO_4 y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se resuspende en una mezcla de acetato de etilo/hexano (1:1) y se filtra a través de gel de sílice obteniéndose, tras evaporación del disolvente a presión reducida, **14**

en forma de sólido. Rto: 42%. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.⁶⁶ ¹H-RMN (300 MHz, acetona-*d*₆) δ 1.98-2.05 (m, 4H, 2CH₂), 4.61-4.65 (m, 2H, 2CH), 7.20-7.23 (m, 2H, Ar), 7.44-7.47 (m, 2H, Ar).

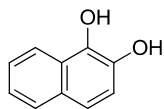


(±)-trans-1,2,3,4-Tetrahydronaftaleno-1,4-diol (15). A una disolución de Red-Al® (1 M en tolueno, 12 mL, 3 equivalentes) bajo atmósfera de argón con agitación y a -78 °C se añade gota a gota una disolución de 640 mg de **19** (4.0 mmol, 1 equivalente) en 80 mL de THF. La mezcla de reacción se agita durante 2 h y se deja que alcance la temperatura ambiente. La reacción se detiene mediante la adición de 77 mL de una disolución saturada de tartrato sódico-potásico seguida de agitación a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se extrae con éter etílico, los extractos orgánicos se juntan, se secan sobre Na₂SO₄ y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se resuspende en una mezcla de acetato de etilo/hexano (1:1) y se filtra a través de 10 g de gel de sílice obteniéndose, después de evaporar el disolvente a presión reducida, **15** en forma de sólido el cual se purifica por medio de cromatografía en columna utilizando una mezcla de DCM/acetato de etilo 9:1 (R_f 0.10). Rto: 36%. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.⁶⁶ ¹H-RMN (300 MHz, acetona-*d*₆) δ 1.73-1.74 (m, 2H, CH₂), 2.20-2.25 (m, 2H, CH₂), 4.70-4.72 (m, 2H, 2CH), 7.20-7.23 (m, 2H, Ar), 7.43-7.47 (m, 2H, Ar).



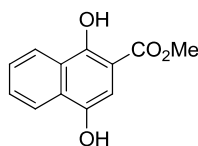
1,2-Dihidroxinaftaleno (16). A una disolución de 1.00 g de 1,2-naftohidroquinona (6.2 mmol, 1 equivalente) en 95 mL de etanol se añade gota a gota una suspensión de 236 mg de NaBH₄ (62 mmol, 10 equivalentes) en 15 mL de etanol. La mezcla se agita bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 1.5 h. Pasado este tiempo, la reacción se vierte en una matraz con 75 mL de hielo-agua, se acidifica con HCl 0.5 M, se extrae con DCM, se seca sobre Na₂SO₄ y el disolvente se elimina a presión reducida dando lugar a **16** en forma de sólido que se puede usar sin necesidad de purificación posterior. Rto: 79%. Los datos

espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.⁶⁷ ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 7.11 (d, J = 7.1, 1H), 7.23-7.26 (m, 1H), 7.27 (d, J = 6.3, 1H), 7.32-7.35 (m, 1H), 7.68 (d, J = 8.2, 1H), 8.06 (d, J = 8.3, 1H).



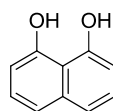
16

1,4-Dihidroxi-2-naftoato de metilo (17). A una disolución del ácido 1,4-dihidroxi-2-naftoico (1 equivalente, 9.8 mmol) en 20 mL de DMF se añade por este orden 1.90 mL de DIEA (10.8 mmol, 1.1 equivalentes) y 1.40 mL de sulfato de dimetilo (14.7 mmol, 1.5 equivalentes). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h, tiempo tras el cual se añade una disolución saturada de NaHCO₃. El sólido resultante **17** se aísla mediante filtración, se lava con agua fría y se seca a vacío, purificándose por recristalización de CHCl₃. Rto: 37%. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.⁶⁸ ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 3.96 (s, 3H, Me), 4.88 (s, 1H, OH), 7.09 (s, 1H, Ar), 7.55-7.58 (m, 1H, Ar), 7.61-7.65 (m, 1H, Ar), 8.11 (d, J = 8.0, 1H, Ar), 8.38 (d, J = 8.4, 1H, Ar), 11.54 (s, 1H, OH).



17

1,8-Dihidroxinaftaleno (18). En un crisol de porcelana se mezclan 1.00 g de 1,8-naftosultona (4.8 mmol, 1 equivalente) con 4.07 g de KOH (72.7 mmol, 15 equivalentes) y se calienta con ayuda de un mechero Bunsen a 300 °C durante 30 min, obteniéndose un líquido homogéneo de color negro. Se deja que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente y se añade HCl (disolución de HCl conc.:H₂O 1:2) hasta pH neutro. La mezcla de reacción se diluye con 40 mL de agua y se extrae con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se juntan, se secan sobre Na₂SO₄ y se elimina el disolvente a presión reducida. El aceite obtenido se purifica mediante cromatografía en columna usando una mezcla de hexano:acetato de etilo 8:2 (R_f 0.26) obteniéndose **18** en forma de sólido. Rto: 49%. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.⁶⁹ ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 6.81 (dd, J = 7.4, 1.1, 2H, Ar), 7.27-7.33 (m, 2H, Ar), 7.38 (dd, J = 8.3, 1.1, 2H, Ar), 7.98 (s a, 2H, 2OH).



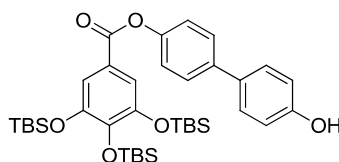
18

5.1.2.5. Síntesis de los monésteres intermedios **95** y **96**.

Procedimiento general. El ácido activado unido a la resina de poliestireno correspondiente **11a** u **85a** (0.5 equivalentes) se hace reaccionar con 4,4'-bifenilo-1,1'-diol (1 equivalente) en presencia de DIEA (1.43 equivalentes), en THF (10 mL/mmol de ácido) como disolvente. La reacción se mantiene a temperatura ambiente, con agitación magnética y en atmósfera de argón durante una noche. Pasado este tiempo la reacción se filtra y el crudo de reacción se lava consecutivamente con NH₄Cl saturado, agua y NaCl saturado. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose los monoésteres **95** y **96** en forma de sólido que se usan sin necesidad de purificación posterior.

3,4,5-Tris(terc-butildimetilsililoxi)benzoato de 4'-hidroxi-1,1'-bifenil-4-ilo (95).

Se obtuvo a partir de 1.12 g de **11a**. Rto: 30%; p.f. 249-253 °C; IR ν 3435 (OH), 1720 (C=O), 1591 (Ar), 1170 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.17 (s, 6H, Me₂SiO *para*), 0.26 (s, 12H, Me₂SiO *meta*), 0.97 (s, 18H, *t*-BuSiO *meta*), 1.01 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 6.87-6.91 (m, 2H, bifenilo), 7.23-7.26 (m, 2H, bifenilo), 7.39 (s, 2H, gal), 7.43-7.48 (m, 2H, bifenilo), 7.53-7.58 (m, 2H, bifenilo); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ -3.8 (2CH₃ Me₂SiO *para*), -3.6 (4CH₃ Me₂SiO *meta*), 18.6 (C *t*-BuSiO *para*), 18.9 (2C *t*-BuSiO *meta*), 26.2 (3CH₃ *t*-BuSiO *para*), 26.3 (6CH₃ *t*-BuSiO *meta*), 115.8 (2CH bifenilo), 116.2 (2CH gal), 121.0 (C gal), 122.0, 127.7, 128.3 (6CH bifenilo), 132.5, 138.8 (2C bifenilo), 144.2, 148.7 (3C gal), 149.9, 155.8 (C bifenilo), 165.6 (C=O); ESI-MS 679.3 (M – H)[–].

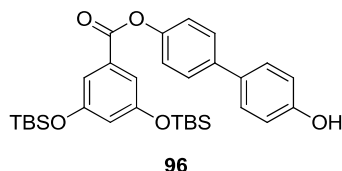


95

3,5-Bis(terc-butildimetilsililoxi)benzoato de 4'-hidroxi-1,1'-bifenil-4-ilo (96).

Se obtuvo a partir de 500 mg de **85a**. Rto: 58%; p.f. 169-172 °C; IR ν 1735 (C=O), 1579 (Ar), 1193 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.26 (s, 12H, Me₂SiO), 1.02

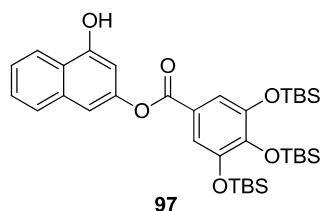
(s, 18H, *t*-BuSiO), 5.79 (s, 1H, OH), 6.65 (t, $J = 2.3$, 1H, α -resorcílico), 6.79-6.83 (m, 2H, bifenilo), 7.23-7.26 (m, 2H, bifenilo), 7.34 (d, $J = 2.3$, 2H, α -resorcílico), 7.37-7.40 (m, 2H, bifenilo), 7.52-7.55 (m, 2H, bifenilo); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -4.3 (4CH₃ Me₂SiO), 18.3 (2C *t*-BuSiO), 25.7 (6CH₃ *t*-BuSiO), 115.2, 115.7 (2CH bifenilo, 2CH α -resorcílico), 117.7 (CH α -resorcílico), 122.0, 127.8, 128.3 (6CH bifenilo), 131.0 (C α -resorcílico), 132.7, 138.9, 149.8, 155.5 (4C bifenilo), 156.8 (2C α -resorcílico), 165.7 (C=O); ESI-MS 550.3 ($\text{M} - \text{H}$)⁻.



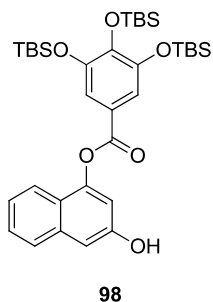
5.1.2.6. Síntesis de los monoésteres intermedios **97-100**.

Procedimiento general. A una disolución de 1,3-dihidroxi-naftaleno (4 equivalentes) y TEA (4 equivalentes) en DCM (10 mL/mmol de cloruro de ácido) se añade gota a gota el cloruro de ácido **11b** u **85b** (1 equivalente) disuelto en DCM (2 mL/mmol de cloruro de ácido) y se agita bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante una noche. A continuación el crudo de reacción se lava con NaHCO_3 y con agua, la fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose la mezcla de los monoésteres correspondientes **97**, **98** ó **99**, **100** que se separan por cromatografía en columna utilizando DCM:hexano 8:2 como eluyente.

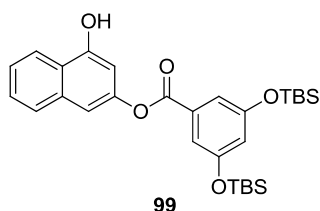
3,4,5-Tris(terc-butildimetilsililoxi)benzoato de 4-hidroxi-2-naftilo (97). Se obtuvo a partir de 518 mg del cloruro de ácido **11b** y 625 mg de 1,3-dihidroxi-naftaleno. Rto: 38%; p.f. 68-70 °C; IR ν 3386 (OH), 1796 (C=O), 1581 (Ar), 1086 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.22 (s, 6H, Me₂SiO *para*), 0.31 (s, 12H, Me₂SiO *meta*), 1.00 (s, 18H *t*-BuSiO *meta*), 1.06 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 6.73 (d, $J = 2.0$, 1H, naft), 6.96 (s, 1H, OH), 7.23 (d, $J = 1.9$, 1H, naft), 7.27-7.34 (m, 1H, naft), 7.44-7.49 (m, 3H, gal, naft), 7.50 (d, $J = 8.2$, 1H, naft), 7.89 (d, $J = 8.3$, 1H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.4 (2CH₃ Me₂SiO *para*), -3.1 (4CH₃ Me₂SiO *meta*), 19.0 (C *t*-BuSiO *para*), 19.3 (2C *t*-BuSiO *meta*), 26.5 (3CH₃ *t*-BuSiO *para*), 26.6 (6CH₃ *t*-BuSiO *meta*), 104.9, 110.9 (2CH naft), 116.6 (2CH gal), 121.3 (C gal), 122.5 (CH naft), 123.5 (C naft), 125.0, 127.4, 127.6 (3CH naft), 134.9 (C naft), 144.8 (C gal), 149.0 (C naft), 149.2 (2C gal), 153.7 (C naft), 166.6 (C=O); ESI-MS 654.1 ($\text{M} - \text{H}$)⁻.



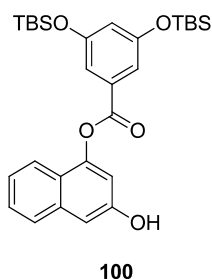
3,4,5-Tris(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoato de 3-hidroxi-1-naftilo (98). Se obtuvo a partir de 518 mg del cloruro de ácido **11b** y 625 mg de 1,3-dihidroxinaftaleno. Rto: 33%; p.f. 159-162 °C; IR ν 3406 (OH), 1711 (C=O), 1577 (Ar), 1090 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.22 (s, 6H, Me_2SiO *para*), 0.30 (s, 12H, Me_2SiO *meta*), 1.00 (s, 18H, *t*-BuSiO *meta*), 1.05 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 6.89 (d, $J = 2.1$, 1H, naft), 7.06 (d, $J = 2.3$, 1H, naft), 7.26-7.35 (m, 1H, naft), 7.37-7.43 (m, 1H, naft), 7.53-7.55 (m, 3H, gal, naft), 7.85 (d, $J = 8.3$, 1H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.8 (2CH₃ Me_2SiO *para*), -3.6 (4CH₃ Me_2SiO *meta*), 18.6 (C *t*-BuSiO *para*), 18.9 (2C *t*-BuSiO *meta*), 26.2 (9CH₃ *t*-BuSiO), 107.9, 111.1 (2CH naft), 116.3 (2CH gal), 120.7 (C gal), 121.2 (CH naft), 122.4 (C naft), 123.9, 126.6, 127.0 (3CH naft), 135.3 (C naft), 144.4 (C gal), 147.7 (C naft), 148.9 (2C gal), 153.4 (C naft), 165.2 (C=O); ESI-MS 654.2 ($\text{M} - \text{H}^-$).



3,5-Bis(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoato de 4-hidroxi-2-naftilo (99). Se obtuvo a partir de 419 mg del cloruro de ácido **85b** y 669 mg de 1,3-dihidroxinaftaleno. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.23 (s, 12H, Me_2SiO), 0.99 (s, 18H, *t*-BuSiO), 6.63 (t, $J = 2.3$, 1H, α -resorcílico), 7.17 (d, $J = 1.9$, 1H, naft), 7.19-7.24 (m, 2H, naft), 7.35 (d, $J = 2.3$, 2H, α -resorcílico), 7.38-7.40 (m, 1H, naft), 7.67 (d, $J = 8.2$, 1H, naft), 7.78 (d, $J = 8.4$, 1H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.9 (4CH₃ Me_2SiO), 18.7 (2C *t*-BuSiO), 26.2 (6CH₃ *t*-BuSiO), 104.7, 110.9 (2CH naft), 115.7, 118.3 (3CH α -resorcílico), 122.6 (CH naft), 123.7 (C naft), 125.1, 127.5, 127.6 (3CH naft), 131.4 (C α -resorcílico), 134.9 (C naft), 148.7, 154.0 (2C naft), 157.8 (2C α -resorcílico), 166.9 (C=O); ESI-MS 523.2 ($\text{M} - \text{H}^-$).



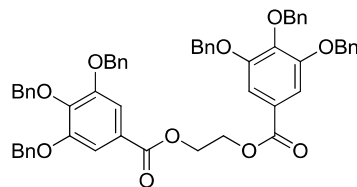
3,5-Bis(terc-butildimetilsililoxy)benzoato de 3-hidroxi-1-naftilo (100). Se obtuvo a partir de 419 mg del cloruro de ácido **85b** y 669 mg de 1,3-dihidroxi-naftaleno. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.29 (s, 12H, Me_2SiO), 1.04 (s, 18H, $t\text{-BuSiO}$), 6.70 (t, J = 2.2, 1H, α -resorcílico), 6.89 (d, J = 2.2, 1H, naft), 7.03 (d, J = 2.2, 1H, naft), 7.29-7.43 (m, 2H, naft), 7.45 (d, J = 2.4, 2H, α -resorcílico), 7.45 (d, J = 8.1, 1H, naft), 7.54 (d, J = 8.1, 1H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.9 (4 CH_3 Me_2SiO), 18.7 (2C $t\text{-BuSiO}$), 26.1 (6 CH_3 $t\text{-BuSiO}$), 108.6, 111.6 (2CH naft), 115.7, 118.4 (3CH α -resorcílico), 121.5 (CH naft), 122.5 (C naft), 124.3, 127.1, 127.4 (3CH naft), 131.1 (C α -resorcílico), 135.7, 147.9, 153.9 (3C naft), 157.4 (2C α -resorcílico), 165.9 (C=O); ESI-MS 523.2 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.



5.1.2.7. Síntesis de los diésteres intermedios **20-23**, **26-31**, **33-35**, **37-39**, **87** y **89**.

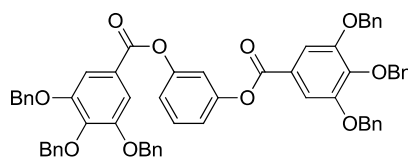
Procedimiento general. El ácido activado unido a la resina de poliestireno correspondiente **5a**, **11a** u **85a** (2.14 equivalentes) se hace reaccionar con el diol adecuado (1 equivalente) en presencia de DIEA (2.86 equivalentes), en THF (10 mL/mmol de ácido) como disolvente. La reacción se mantiene a temperatura ambiente, con agitación magnética y en atmósfera de argón durante una noche. Pasado este tiempo el crudo de reacción se filtra a través de gel de sílice y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se resuspende en DCM y se lava con NH_4Cl saturado, agua y NaCl saturado. La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose los productos deseados en forma de sólido que se usan en la siguiente reacción sin necesidad de purificaciones adicionales.

1,2-Bis([3,4,5-tris(benciloxi)benzoil]oxi)etano (20). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **5a** y 15.3 mg de etilenglicol. Rto: 71%; p.f. 130-132 °C; IR ν 1717 (C=O), 1595 (Ar), 1500 (Ar), 1132 (C-O); ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) δ 4.72 (s, 4H, 2CH_2 etileno), 5.16 (s, 8H, 4CH_2 *meta*), 5.18 (s, 4H, 2CH_2 *para*), 7.30-7.48 (m, 34H, Bn, gal); ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) δ 62.5 (2CH_2 etileno), 71.1 (4CH_2 *meta*), 75.0 (2CH_2 *para*), 109.1 (4CH gal), 124.7 (2C gal), 127.4, 127.8, 127.9, 128.1, 128.3, 128.4 (30CH Bn), 136.4, 137.3 (6C Bn), 142.7 (2C gal), 152.4 (4C gal), 165.8 (2C=O); ESI-MS 929.0 (M + Na) $^+$.



20

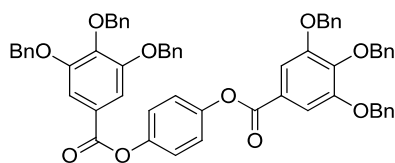
1,3-Bis([3,4,5-tris(benciloxi)benzoil]oxi)benceno (21). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **5a** y 27.2 mg de resorcinol. Rto: 68%; p.f. 194-196 °C; IR ν 1734 (C=O), 1593 (Ar), 1500 (Ar), 1128 (C-O); ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) δ 5.19 (s, 12H, 6CH_2), 7.13-7.45 (m, 34H, Bn, Ph), 7.55 (s, 4H, gal); ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) δ 71.3 (4CH_2 *para*), 75.2 (2CH_2 *meta*), 109.7 (4CH gal), 115.9 (CH Ph), 119.3 (2CH Ph), 124.2 (2C gal), 127.6, 128.0, 128.1, 128.2, 128.5, 128.6 (30CH Bn, CH Ph), 136.5, 137.3 (6C Bn), 143.2 (2C gal), 151.9, 152.7 (4C gal, 2C Ph), 164.4 (2C=O); ESI-MS 977.1 (M + Na) $^+$.



21

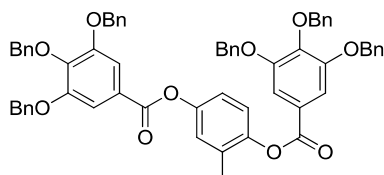
1,4-Bis([3,4,5-tris(benciloxi)benzoil]oxi)benceno (22). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **5a** y 27.2 mg de hidroquinona. Rto: 24%; p.f. 194-196 °C; IR ν 1732 (C=O), 1589 (Ar), 1500 (Ar), 1118 (C-O); ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) δ 5.18 (s, 8H, 4CH_2 *meta*), 5.19 (s, 4H, 2CH_2 *para*), 7.25-7.48 (m, 34H, Bn, Ph), 7.54 (s, 4H, gal); ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) δ 71.7 (4CH_2 *meta*), 75.6 (2CH_2 *para*), 110.0 (4CH gal), 123.1 (4CH Ph), 124.6 (2C gal), 128.0, 128.4,

128.5, 128.6, 128.9, 129.0 (30CH Bn), 136.9, 137.7 (6C Bn), 143.4 (2C gal), 148.8 (2C Ph), 153.1 (4C gal), 165.0 (2C=O); ESI-MS 977.1 (M + Na)⁺.



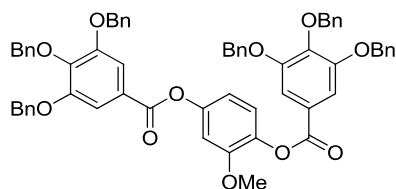
22

2-Metil-1,4-bis([3,4,5-tris(benciloxi)benzoil]oxi)benceno (23). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **5a** y 30.5 mg de 2-metil-1,4-dihidroxibenceno. Rto: 52%; p.f. 186-188 °C; IR ν 1734 (C=O), 1585 (Ar), 1500 (Ar), 1115 (C-O); ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) δ 2.13 (s, 3H, CH₃), 5.10 (s, 8H, 4CH₂ *meta*), 5.11 (s, 4H, 2CH₂ *para*), 6.96-7.41 (m, 33H, Bn, Ph), 7.45 (s, 2H, gal), 7.47 (s, 2H, gal); ¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃) δ 16.5 (CH₃), 71.3 (4CH₂ *meta*), 75.2 (2CH₂ *para*), 109.7 (4CH gal), 119.9, 122.8, 124.0 (3CH Ph), 124.0, 124.2 (2C gal), 127.4, 127.5, 127.9, 128.0, 128.1, 128.4, 128.5 (30CH Bn), 131.7 (C Ph), 136.4, 137.3 (6C Bn), 143.0, 143.1 (2C gal), 147.0, 148.3 (2C Ph), 152.6 (4C gal), 164.2, 164.6 (2C=O); ESI-MS 991.1 (M + Na)⁺.



23

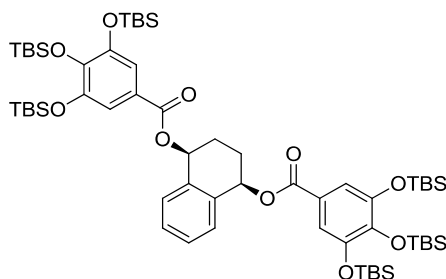
2-Metoxi-1,4-bis([3,4,5-tris(benciloxi)benzoil]oxi)benceno (26). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **5a** y 36.6 mg de 2-metoxi-1,4-dihidroxibenceno. Rto: 30%; p.f. 197-198 °C; IR ν 1735 (C=O), 1585 (Ar), 1506 (Ar), 1115 (C-O); ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) δ 3.90 (s, 3H, OCH₃), 5.24 (s, 4H, 2CH₂ *para*), 5.26 (s, 8H, 4CH₂ *meta*), 6.88-6.96 (m, 2H, Ph), 7.25 (d, *J* = 8.4, 1H, Ph), 7.34-7.57 (m, 30H, Bn), 7.62 (s, 2H, gal), 7.65 (s, 2H, gal); ¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃) δ 56.1 (OCH₃), 71.2, 71.3 (4CH₂ *meta*), 75.1 (2CH₂ *para*), 106.8 (CH Ph), 109.7, 109.8 (4CH gal), 113.5, 123.1 (2CH Ph), 124.2 (2C gal), 127.5, 127.6, 128.0, 128.2, 128.5 (30CH Bn), 136.5, 137.3, 137.4, 137.6 (6C Bn, C Ph), 143.0, 143.1 (2C gal), 149.3, 151.9 (2C Ph), 152.6, 152.7 (4C gal), 164.1, 164.5 (2C=O); ESI-MS 1007.1 (M + Na)⁺.



26

cis-1,4-Bis[(3,4,5-tris(*tert*-butildimetilsililoxy)benzoyl)oxi]-1,2,3,4-

tetrahidronaftaleno (27). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **11a** y 40.6 mg de **14**. Rto: 20%; p.f. 81-82 °C; IR ν 1716 (C=O), 1577 (Ar), 1086 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.15 (s, 12H, 2Me₂SiO *para*), 0.23 (s, 24H, 4Me₂SiO *meta*), 0.94 (s, 36H, 4*t*-BuSiO *meta*), 1.01 (s, 18H, 2*t*-BuSiO *para*), 2.22-2.37 (m, 4H, 2CH₂ tetrahidronaft), 6.13 (s a, 2H, 2CH tetrahidronaft), 7.28 (s, 4H, gal), 7.32-7.35 (m, 2H, tetrahidronaft), 7.45-7.47 (m, 2H, tetrahidronaft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.5, -3.3 (12CH₃ Me₂SiO), 18.9, 19.2 (6C *t*-BuSiO), 26.3 (2CH₂ tetrahidronaft), 26.5, 26.6 (18CH₃ *t*-BuSiO), 70.5 (2CH tetrahidronaft), 116.0 (4CH gal), 122.5 (2C gal), 128.7, 128.9 (4CH tetrahidronaft), 136.2 (2C tetrahidronaft), 143.7, 148.8 (6C gal), 166.3 (2C=O); ESI-MS 1175 (M + Na)⁺.

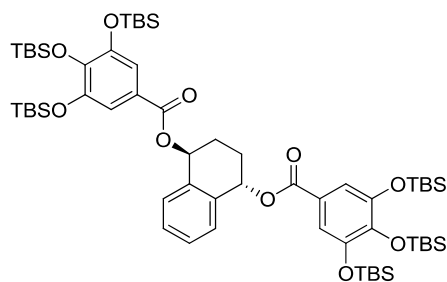


27

(±)-trans-1,4-Bis[(3,4,5-tris(*tert*-butildimetilsililoxy)benzoyl)oxi]-1,2,3,4-

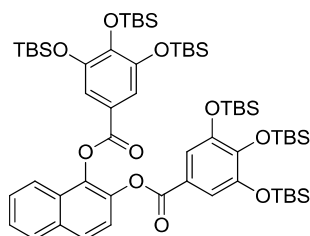
tetrahidronaftaleno (28). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **11a** y 40.6 mg de **(±)-15**. Rto: 53%; p.f. 68-70 °C; IR ν 1716 (C=O), 1577 (Ar), 1089 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.15 (s, 12H, 2Me₂SiO *para*), 0.23 (s, 24H, 4Me₂SiO *meta*), 0.94 (s, 36H, 4*t*-BuSiO *meta*), 1.01 (s, 18H, 2*t*-BuSiO *para*), 2.22-2.37 (m, 4H, 2CH₂ tetrahidronaft), 6.13 (s a, 2H, 2CH tetrahidronaft), 7.28 (s, 4H, gal), 7.32-7.35 (m, 2H, tetrahidronaft), 7.45-7.47 (m, 2H, tetrahidronaft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.5, -3.3 (12CH₃ Me₂SiO), 18.9, 19.2 (6C *t*-BuSiO), 25.6 (2CH₂ tetrahidronaft), 26.5, 26.6 (18CH₃ *t*-BuSiO), 69.9

(2CH tetrahidronaft), 115.9 (4CH gal), 122.5 (2C gal), 129.1, 130.1 (4CH tetrahidronaft), 135.7 (2C tetrahidronaft), 143.7, 148.8 (6C gal), 166.2 (2C=O); ESI-MS 1175.6 (M + Na)⁺.



28

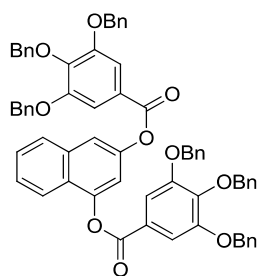
1,2-Bis[(3,4,5-tris(*tert*-butyldimethylsilyloxy)benzoyl)oxy]naphthaleno (29). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **11a** y 39.6 mg de 1,2-dihidroxinaftaleno. Rto: 60%; p.f. 78-80 °C; IR ν 1747 (C=O), 1577 (Ar), 1086 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.14 (s, 6H, Me₂SiO *para*), 0.17 (s, 6H, Me₂SiO *para*), 0.20 (s, 12H, 2Me₂SiO *meta*), 0.24 (s, 12H, 2Me₂SiO *meta*), 0.94 (s, 18H, *t*-BuSiO *meta*), 0.96 (s, 18H, *t*-BuSiO *meta*), 1.00 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 1.03 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 7.35 (s, 2H, gal), 7.45 (s, 2H, gal), 7.46 (d, *J* = 8.9, 1H, naft), 7.50-7.53 (m, 2H, naft), 7.82 (d, *J* = 8.9, 1H, naft), 7.88-7.92 (m, 2H, naft); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ -3.8, -3.6 (12CH₃ Me₂SiO), 18.5, 18.8 (6C *t*-BuSiO), 26.1, 26.2 (18CH₃ *t*-BuSiO), 116.1, 116.4 (4CH gal), 120.2, 120.6 (2C gal), 121.4, 122.3, 126.0, 126.4, 126.8, 128.0 (6CH naft), 128.3, 132.4, 137.5, 140.1 (4C naft), 143.9, 144.1 (2C gal), 148.5, 148.6 (4C gal), 163.5, 164.2 (2C=O); ESI-MS 1171.6 (M + Na)⁺.



29

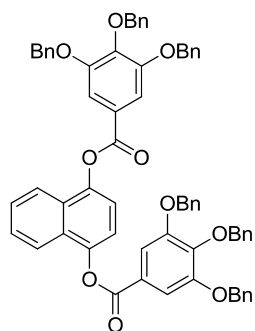
1,3-Bis[(3,4,5-tris(benciloxi)benzoyl)oxy]naphthaleno (30). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **5a** y 39.6 mg de dihidroxinaftaleno. Rto: 47%; p.f. 160-161 °C; IR ν 1733 (C=O), 1587 (Ar), 1499 (Ar), 1186 (C-O); ¹H-

RMN (200 MHz, DMSO- d_6) δ 5.13 (s, 2H, CH₂ *para*), 5.15 (s, 2H, CH₂ *para*), 5.27 (s, 4H, 2CH₂ *meta*), 5.30 (s, 4H, 2CH₂ *meta*), 7.32-7.49 (m, 31H, Bn, naft), 7.62 (s, 2H, gal), 7.67 (m, 4H, gal, naft), 7.82-7.89 (m, 2H, naft), 8.07-8.10 (m, 1H, naft); ¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃) δ 71.3 (4CH₂ *meta*), 75.3 (2CH₂ *para*), 109.7, 109.8 (4CH gal), 114.4, 116.9, 121.5 (3CH naft), 123.9, 124.2, 125.2 (2C gal, C naft), 126.3, 127.3 (2CH naft), 127.5, 127.6, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.5, 128.6 (30CH Bn, CH naft), 134.4 (C naft), 136.5, 136.6, 137.4 (6C Bn), 143.2, 143.4 (2C gal), 147.4, 147.9 (2C naft), 152.7, 152.8 (4C gal), 164.3, 164.6 (2C=O); ESI-MS 1027.4 (M + Na)⁺.



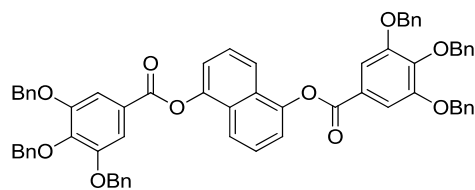
30

1,4-Bis([3,4,5-tris(benciloxi)benzoil]oxi)naftaleno (31). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **5a** y 39.6 mg de 1,4-dihidroxinaftaleno. Rto: 64%; p.f. 168-170 °C; IR ν 1735 (C=O), 1589 (Ar), 1500 (Ar), 1114 (C-O); ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) δ 5.08 (s, 4H, 2CH₂ *para*), 5.09 (s, 8H, 4CH₂ *meta*), 7.13-7.43 (m, 34H, Bn, naft), 7.53 (s, 4H, gal), 7.70-7.75 (m, 2H, naft); ¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃) δ 71.4 (4CH₂ *meta*), 75.2 (2CH₂ *para*), 109.8 (4CH gal), 117.9, 121.7 (4CH naft), 124.0 (2C gal), 127.0 (2CH naft), 127.5, 127.8, 128.0, 128.1, 128.2, 128.5, 128.6 (30CH Bn, 2C naft), 136.5, 137.3 (6C Bn), 143.2, 144.6 (2C gal, 2C naft), 152.7 (4C gal), 164.6 (2C=O); ESI-MS 1027.2 (M + Na)⁺.



31

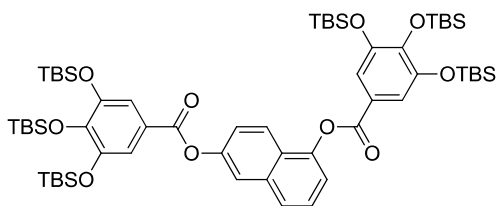
1,5-Bis([3,4,5-tris(benciloxi)benzoyl]oxi)naftaleno (33). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **5a** y 39.6 mg de 1,5-dihidroxinaftaleno. Rto: 42%; p.f. 229-231 °C; IR ν 1736 (C=O), 1597 (Ar), 1500 (Ar), 1194 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 5.14 (s, 4H, 2CH_2 *para*), 5.29 (s, 8H, 4CH_2 *meta*), 7.21-7.44 (m, 34H, Bn, naft), 7.58 (s, 4H, gal), 7.70 (d, $J = 8.3$, 2H, naft); $^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 71.4 (4CH_2 *meta*), 75.3 (2CH_2 *para*), 109.9 (4CH gal), 119.0, 119.6 (4CH naft), 124.0 (2C gal), 126.2 (2CH naft), 127.6, 128.1, 128.3, 128.4, 128.6, 128.6 (30CH Bn, 2C naft), 136.5, 137.4 (6C Bn), 143.4 (2C gal), 147.1 (2C naft), 152.8 (4C gal), 164.6 (2C=O); ESI-MS 1027.1 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.



33

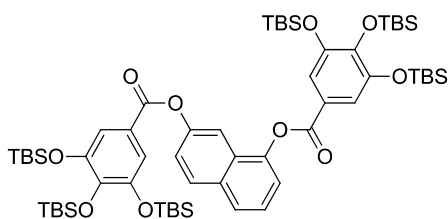
1,6-Bis[(3,4,5-tris(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoyl]oxi)naftaleno (34). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **11a** y 39.6 mg de 1,6-dihidroxinaftaleno. Rto: 24%; p.f. 194-196 °C; IR ν 1740 (C=O), 1638 (Ar), 1089 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 0.20 (s, 6H, Me_2SiO *para*), 0.22 (s, 6H, Me_2SiO *para*), 0.30 (s, 12H, $2\text{Me}_2\text{SiO}$ *meta*), 0.31 (s, 12H, $2\text{Me}_2\text{SiO}$ *meta*), 1.00 (s, 18H, *t*-BuSiO *meta*), 1.01 (s, 18H, *t*-BuSiO *meta*), 1.04 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 1.06 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 7.37-7.44 (m, 2H gal, 2H naft), 7.53-7.58 (m, 2H gal, 1H naft), 7.75-7.77 (m, 2H naft), 8.04 (d, $J = 9.1$, 1H, naft); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ -3.4, -3.2 (12CH_3 Me_2SiO), 18.9, 19.3 (6C *t*-BuSiO), 26.5, 26.6 (18CH_3 *t*-BuSiO), 116.5 (4CH gal), 118.5, 119.2 (2CH naft), 121.3, 121.5 (2C gal), 122.4, 123.4 (2CH naft), 125.5 (C naft), 125.9, 126.8 (2CH naft), 135.6 (C naft), 144.5 (2C gal), 147.5 (C naft),

149.1, 149.2 (4C gal), 149.8 (C naft), 165.1, 165.2 (2C=O); ESI-MS 1171.6 (M + Na)⁺.



34

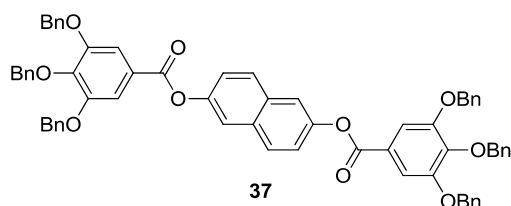
1,7-Bis[(3,4,5-tris(*tert*-butyldimethylsiloxy)benzoyloxy)naphthaleno (35). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **11a** y 39.6 mg de 1,7-dihidroxinaftaleno. Rto: 24%; p.f. 73-75 °C, IR ν 1741 (C=O), 1578 (Ar), 1089 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.17 (s, 6H, Me₂SiO *para*), 0.19 (s, 6H, Me₂SiO *para*), 0.26 (s, 12H, 2Me₂SiO *meta*), 0.27 (s, 12H, 2Me₂SiO *meta*), 0.96 (s, 18H, *t*-BuSiO *meta*), 0.97 (s, 18H, *t*-BuSiO *meta*), 1.02 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 1.03 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 7.37-7.41 (m, 2H gal, 1H naft), 7.47-7.55 (m, 2H gal, 2H naft), 7.79-7.81 (m, 2H naft), 7.96 (d, *J* = 9.0, 1H, naft); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ -3.5; -3.4; -3.2 (12CH₃ Me₂SiO), 18.9, 19.2 (6C *t*-BuSiO), 26.5, 26.6 (18CH₃ *t*-BuSiO), 113.2 (CH naft), 116.5, 116.6 (4CH gal), 119.3 (CH naft), 121.3, 121.5 (2C gal), 122.7, 125.7, 125.8 (3CH naft), 128.1 (C naft), 129.9 (CH naft), 133.1 (C naft), 144.4 (2C gal), 147.0 (C naft), 149.0, 149.1 (4C gal), 149.9 (C naft), 164.9, 165.3 (2C=O); ESI-MS 1171.8 (M + Na)⁺.



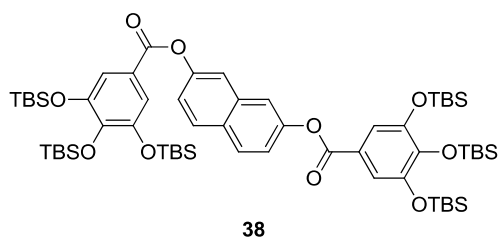
35

2,6-Bis[(3,4,5-tris(benzoyloxy)benzoyloxy)naphthaleno (37). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **5a** y 39.6 mg de 2,6-dihidroxinaftaleno. Rto: 39%; p.f. 236-238 °C; IR ν 1728 (C=O), 1589 (Ar), 1500 (Ar), 1190 (C-O); ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) δ 5.10 (s, 4H, 2CH₂ *para*), 5.12 (s, 8H, 4CH₂ *meta*), 7.23-7.37 (m, 32H, Bn, naft), 7.52 (s, 4H, gal), 7.63 (s, 2H, naft),

7.83 (d, $J = 8.9$, 2H, naft); ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) δ 71.9 (4CH_2 *meta*), 75.6 (2CH_2 *para*), 110.3 (4CH gal), 119.1, 122.5 (4CH naft), 124.8 (2C gal), 128.0, 128.4, 128.5, 128.6, 128.6, 129.0 (30CH Bn), 129.5 (2CH naft), 132.3 (2C naft), 137.0, 137.8 (6C Bn), 143.7 (2C gal), 149.1 (2C naft), 153.2 (4C gal), 165.2 ($2\text{C}=\text{O}$); ESI-MS 1027.3 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺.

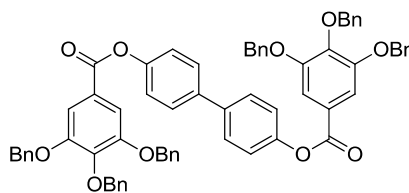


2,7-Bis[(3,4,5-tris(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoyl)oxi]naftaleno (38). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **11a** y 39.6 mg de 2,7-dihidroxinaftaleno. Rto: 39%; p.f. 66-67 °C; IR ν 1741 ($\text{C}=\text{O}$), 1578 (Ar), 1082 ($\text{C}-\text{O}$); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.19 (s, 12H, $2\text{Me}_2\text{SiO}$ *para*), 0.29 (s, 24H, $4\text{Me}_2\text{SiO}$ *meta*), 0.99 (s, 36H, $4t\text{-BuSiO}$ *meta*), 1.03 (s, 18H, $2t\text{-BuSiO}$ *para*), 7.36 (dd, $J = 8.9$, 2.2, 2H naft), 7.42 (s, 4H, gal), 7.67 (d, $J = 2.2$, 2H, naft), 7.92 (d, $J = 7.9$, 2H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.9, -3.6 (12CH_3 Me_2SiO), 18.5, 18.8 (6C $t\text{-BuSiO}$), 26.1, 26.2 (18CH_3 $t\text{-BuSiO}$), 116.1 (4CH gal), 118.4 (2CH naft), 121.1 (2C gal), 121.2, 129.1 (4CH naft), 129.3, 134.4 (2C naft), 144.0, 148.7 (6C gal), 149.5 (2C naft), 164.8 ($2\text{C}=\text{O}$); ESI-MS 1171.6 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺.



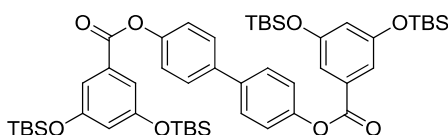
4,4'-Bis[(3,4,5-tris(benciloxi)benzoyl)oxi]-1,1'-bifenilo (39). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina **5a** y 46.0 mg de 4,4'-dihidroxi-1,1'-bifenilo. Rto: 77%; p.f. 241-243 °C; IR ν 1728 ($\text{C}=\text{O}$), 1585 (Ar), 1497 (Ar), 1194 ($\text{C}-\text{O}$); ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) δ 5.18 (s, 4H, 2CH_2 *para*), 5.20 (s, 8H, 4CH_2 *meta*), 7.27-7.50 (m, 34H, Bn, bifenilo), 7.58 (s, 4H, gal), 7.63-7.67 (m, 4H, bifenilo); ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) δ 71.3 (4CH_2 *meta*), 75.1 (2CH_2 *para*), 109.7 (4CH gal), 122.0 (4CH bifenilo), 124.3 (2C gal), 127.5, 127.9, 128.0, 128.2, 128.5,

128.6 (30CH Bn, 4CH bifenilo), 136.5, 137.3, 138.1 (2C bifenilo, 6C Bn), 143.1 (2C gal), 150.4 (2C bifenilo), 152.6 (4C gal), 164.8 (2C=O); ESI-MS 1053.7 (M + Na)⁺.



39

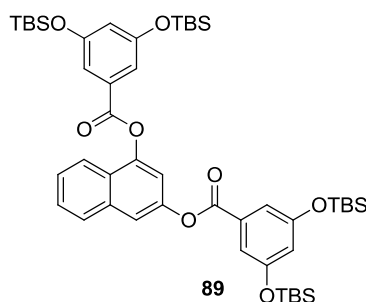
4,4'-Bis[(3,5-bis(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoyl)oxi]-1,1'-bifenilo (87). Se obtuvo a partir 750 mg del ácido activado anclado a la resina de **85a** y 58.0 mg de 4,4'-dihidroxi-1,1'-bifenilo. Rto: 91%; p.f. 224-226 °C; IR ν 1740 (C=O), 1577 (Ar), 1090 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.24 (s, 24H, Me₂SiO), 1.00 (s, 36H, *t*-BuSiO), 6.61 (t, *J* = 2.3, 2H, α -resorcílico), 7.28-7.32 (m, 8H, bifenilo, α -resorcílico), 7.61-7.64 (m, 4H, bifenilo); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ -4.4, (8CH₃ Me₂SiO), 18.3 (4C *t*-BuSiO), 25.7 (12CH₃ *t*-BuSiO), 115.1, 117.5 (6CH α -resorcílico), 122.1, 128.2 (8CH bifenilo), 131.2 (2C α -resorcílico), 138.2, 150.5 (4C bifenilo), 156.8 (4C α -resorcílico), 164.9 (2C=O); ESI-MS 937.4 (M + Na)⁺.



87

1,3-Bis[(3,5-bis(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoyl)oxi]naftaleno (89). Se obtuvo a partir de 750 mg del ácido activado anclado a la resina de **85a** y 58.0 mg de 1,3-dihidroxinaftaleno. Rto: 55%; p.f. 131-133 °C; IR ν 1745 (C=O), 1590 (Ar), 1170 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.24 (s, 12H, 2Me₂SiO), 0.25 (s, 12H, 2Me₂SiO), 1.00 (s, 18H, 2*t*-BuSiO), 1.01 (s, 18H, 2*t*-BuSiO), 6.61 (t, *J* = 2.3, 1H, α -resorcílico), 6.65 (t, *J* = 2.3, 1H, α -resorcílico), 7.31 (d, *J* = 2.3, 2H, α -resorcílico), 7.37 (d, *J* = 2.2, 1H, naft), 7.40 (d, *J* = 2.3, 2H, α -resorcílico), 7.47-7.58 (m, 2H, naft), 7.67 (d, *J* = 2.0, 1H, naft), 7.88 (d, *J* = 7.4, 1H, naft), 7.95 (d, *J* = 7.8, 1H, naft); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ -4.0 (8CH₃ Me₂SiO), 18.6 (4C *t*-BuSi), 26.1 (12CH₃ *t*-BuSi), 114.7 (CH naft), 115.5, 115.6 (4CH α -resorcílico), 117.3, 118.1 (2CH naft), 121.9 (2CH α -resorcílico), 125.6 (C naft), 126.6, 127.7, 128.3 (3CH

naft), 131.1, 131.3 (2C α -resorcílico), 134.7, 147.8, 148.3 (3C naft), 157.3 (2C α -resorcílico), 164.9, 165.2 (2C=O); ESI-MS 911.4 (M + Na)⁺.

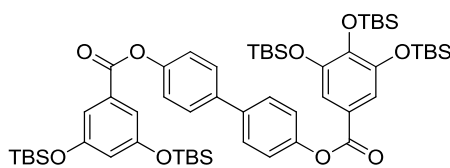


5.1.2.8. Síntesis de los diésteres intermedios **101**, **104** y **107**.

Procedimiento general. Los monoésteres correspondientes **95**, **97** ó **98** (1 equivalente) se tratan con el ácido activado anclado a la resina **85a** (2.1 equivalentes), junto con DIEA (1.43 equivalentes), utilizando tolueno (10 mL/mmól monoéster) como disolvente. La reacción se mantiene con agitación, a temperatura ambiente y en atmósfera de argón durante toda la noche. Pasado este tiempo se filtra la reacción a través de gel de sílice y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se resuspende en DCM y se lava consecutivamente con NH₄Cl saturado, agua y NaCl saturado. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose los diésteres intermedios **101**, **104** y **107**, respectivamente, en forma de sólido que se usan sin necesidad de purificación posterior.

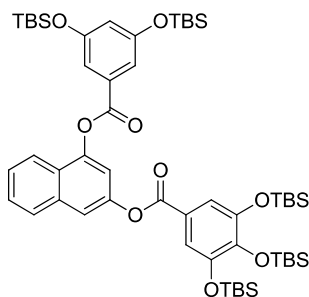
3,4,5-Tris(terc-butildimetilsililo)benzoato de 4'-[(3,5-bis(terc-butildimetilsililo)benzoil)oxi]-1,1'-bifenil-4-ilo (101**).** Se obtuvo a partir de 300 mg del ácido activado anclado a la resina **85a** y 90 mg de **95**. Rto: 81%; p.f. 199-202 °C; IR ν 1739 (C=O), 1588 (Ar), 1194 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.20 (s, 6H, Me₂SiO *para*), 0.27 (s, 12H, Me₂SiO *meta*), 0.29 (s, 12H, Me₂SiO *meta*), 1.00 (s, 18H, *t*-BuSiO *meta*), 1.03 (s, 18H, *t*-BuSiO *meta*), 1.04 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 6.44 (t, *J* = 3.0, 1H, α -resorcílico), 7.31 (d, *J* = 8.6, 4H, bifenilo), 7.33 (d, *J* = 3.0, 2H, α -resorcílico), 7.42 (s, 2H, gal), 7.65 (d, *J* = 8.4, 4H, bifenilo); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ -4.3, -3.8, -3.6 (10CH₃ Me₂SiO), 18.3, 18.6, 18.9 (5C *t*-BuSiO), 25.7, 26.2, 26.3 (15CH₃ *t*-BuSiO), 115.1 (2CH α -resorcílico), 116.1 (2CH gal), 117.6 (CH α -resorcílico), 121.1 (C gal), 122.1, 122.2 (4CH bifenilo), 128.2 (4CH bifenilo), 131.2 (C α -resorcílico), 138.1, 138.3 (2C bifenilo), 144.0, 148.7 (3C gal),

150.5, 150.7 (2C bifenilo), 156.8 (2C α -resorcílico), 164.9 (2C=O); ESI-MS 1067.5 (M + Na)⁺.



101

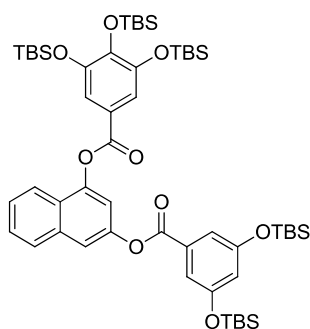
3,4,5-Tris(tert-butildimetilsililoxi)benzoato de 4-[(3,5-bis(tert-butildimetilsililoxi)benzoil)oxi]-2-naftilo (104). Se obtuvo a partir de 463 mg del ácido activado anclado a la resina **85a** y 111 mg de **97**. Rto: 91%; p.f. 149-151 °C; IR ν 1743 (C=O), 1588 (Ar), 1193 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.19 (s, 6H Me₂SiO *para*), 0.27 (s, 12H Me₂SiO *meta*), 0.28 (s, 12H, Me₂SiO *meta*), 0.98 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 1.01 (18H, *t*-BuSiO *meta*), 1.02 (18H, *t*-BuSiO *meta*), 6.66 (t, *J* = 2.3, 1H, α -resorcílico), 7.37 (d, *J* = 2.1, 1H, naft), 7.41 (d, *J* = 2.3, 2H, α -resorcílico), 7.42 (s, 2H, gal), 7.47-7.57 (m, 2H, naft), 7.65 (d, *J* = 1.8, 1H, naft), 7.88 (d, *J* = 7.4, 1H, naft), 7.95 (d, *J* = 7.9, 1H, naft); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ -4.3, -3.8, -3.6 (10CH₃ Me₂SiO), 15.2, 16.0 (5C *t*-BuSiO), 25.7, 26.1, 26.4 (15CH₃ *t*-BuSiO), 114.5 (CH naft), 115.2 (2CH α -resorcílico), 116.2 (2CH gal), 116.9, 117.8 (2CH naft), 121.0 (C gal), 121.5 (CH α -resorcílico), 125.2 (C naft), 126.2, 127.2, 127.9 (3CH naft), 130.8 (C α -resorcílico), 134.4 (C naft), 144.1 (C gal), 147.4, 148.2 (2C naft), 148.7 (2C gal), 156.9 (2C α -resorcílico), 164.5, 164.8 (2C=O); ESI-MS 1041.6 (M + Na)⁺.



104

3,4,5-Tris(tert-butildimetilsililoxi)benzoato de 3-[(3,5-bis(tert-butildimetilsililoxi)benzoil)oxi]-1-naftilo (107). Se obtuvo a partir de 640 mg del ácido activado anclado a la resina **85a** y 153 mg de **98**. Rto: 90%; p.f. 67-71 °C; IR

ν 1743 (C=O), 1588 (Ar), 1190 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.21 (s, 6H Me_2SiO *para*), 0.25 (s, 12H, Me_2SiO *meta*), 0.29 (s, 12H, Me_2SiO *meta*), 0.99 (s, 18H, *t*-BuSiO *meta*), 1.02 (s, 18H, *t*-BuSiO *meta*), 1.04 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 6.62 (t, $J = 2.3$, 1H, α -resorcílico), 7.32 (d, $J = 2.3$, 2H, α -resorcílico), 7.41 (d, $J = 2.1$, 1H, naft), 7.48-7.58 (m, 4H, gal, naft), 7.65 (d, $J = 1.8$, 1H, naft), 7.88 (d, $J = 7.4$, 1H, naft), 8.01 (d, $J = 7.8$, 1H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -4.4, -3.8, -3.6 (10CH_3 , Me_2SiO), 18.3, 18.6, 18.9 (5C *t*-BuSiO), 25.7, 26.1, 26.2 (15CH_3 *t*-BuSiO), 114.3 (CH naft), 115.2 (2CH α -resorcílico), 116.2 (2CH gal), 116.2, 117.7 (2CH naft), 120.7 (C gal), 121.5 (CH α -resorcílico), 125.4 (C naft), 126.1, 127.2, 127.9 (3CH naft), 131.0 (C α -resorcílico), 134.3 (C naft), 144.3 (C gal), 147.6, 148.0 (2C naft), 148.8 (2C gal), 156.8 (2C α -resorcílico), 164.4, 164.8 (2C=O); ESI-MS 1041.6 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.



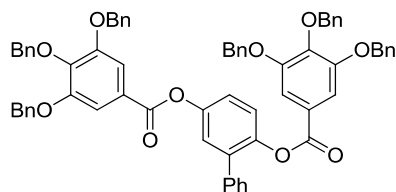
107

5.1.2.9. Síntesis de los diésteres intermedios **24**, **25**, **32**, **36**, **88**, **90**, **102**, **103**, **105**, **106**, **108** y **109**.

Procedimiento general. A una disolución del correspondiente cloruro de ácido **5b**, **11b** u **86b** (2.2 equivalentes) y TEA (2.2 equivalentes) en THF anhidro (10 mL/mmol de diol) se añade el diol o el monoéster correspondiente disuelto en THF (1 equivalente, 2 mL/mmol de diol). La reacción se agita bajo atmósfera de argón durante toda la noche. La mezcla de reacción se concentra a vacío y el residuo se disuelve en DCM y se lava con NaHCO_3 saturado, se seca sobre Na_2SO_4 y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando el eluyente adecuado, obteniéndose el diéster intermedio correspondiente como un sólido blanco.

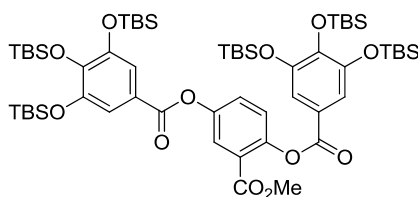
2,5-Bis([3,4,5-tris(benciloxi)benzoi]oxi)-1,1'-bifenilo (24). Se obtuvo a partir de 521 mg del cloruro de ácido **5b** y 85.7 mg de 2,5-dihidroxi-1,1'-bifenilo.

Cromatografía: DCM/hexano 9:1 (R_f 0.46). Rto: 57%; p.f. 162-164 °C; IR ν 1736 (C=O), 1589 (Ar), 1501 (Ar), 1167 (C-O); ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) δ 5.10 (s, 4H, 2CH_2 *meta*), 5.14 (s, 2H, CH_2 *para*), 5.19 (s, 2H, CH_2 *para*), 5.20 (s, 4H, 2CH_2 *meta*), 7.24-7.39 (m, 40H, bifenilo, Bn, gal), 7.87 (s, 2H, gal); ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) δ 71.2, 71.4 (4CH_2 *meta*), 75.1, 75.2 (2CH_2 *para*), 109.6, 109.8 (4CH gal), 121.5, 123.8, 123.9 (3CH bifenilo), 124.2 (2C gal), 127.5, 127.6, 127.7, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 129.0 (5CH bifenilo, 30CH Bn), 135.9, 136.6, 136.8, 137.4 (2C bifenilo, 6C Bn), 143.0, 143.2 (2C gal), 145.4, 148.5 (2C bifenilo), 152.6, 152.7 (4C gal), 164.4, 164.6 ($2\text{C}=\text{O}$); ESI-MS 1053.7 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.



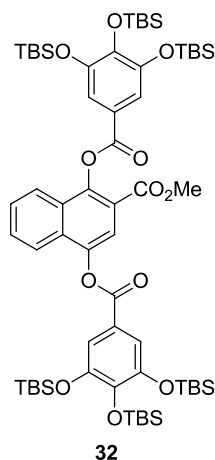
24

2,5-Bis[(3,4,5-tris(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoil)oxi]-2-benzoato de metilo (25). Se obtuvo a partir de 531 mg del cloruro de ácido **11b** y 88.5 mg de 2,5-hihidroxibenzoato de metilo. Cromatografía: DCM/hexano 3:7 (R_f 0.32). Rto: 53%; p.f. 191-192 °C; IR ν 1741 (C=O), 1576 (Ar), 1081 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.18 (s, 12H, $2\text{Me}_2\text{SiO}$ *para*), 0.28 (s, 24H, $4\text{Me}_2\text{SiO}$ *meta*), 0.98 (s, 32H, $2t\text{-BuSiO}$ *meta*), 1.02 (s, 18H, $2t\text{-BuSiO}$ *para*), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 7.28 (d, $J = 8.9$, 1H, Ph), 7.38 (s, 2H, gal), 7.41 (s, 2H, gal), 7.45 (dd, $J = 8.7$, 2.9, 1H, Ph), 7.89 (d, $J = 2.8$, 1H, Ph); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.5, -3.4, -3.2 (12CH_3 Me_2SiO), 18.9, 19.2 (6C $t\text{-BuSiO}$), 26.5, 26.6 (18CH_3 $t\text{-BuSiO}$), 52.6 (OCH_3), 116.5, 116.7 (4CH gal), 121.1, 121.4 (2C gal), 124.9 (C Ph), 125.3, 125.4, 127.4 (3CH Ph), 144.4, 144.6 (2C gal), 148.6, 148.7 (2C Ph), 149.0, 149.1 (4C gal), 164.8, 164.9, 165.4 ($3\text{C}=\text{O}$); ESI-MS 1179.6 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.

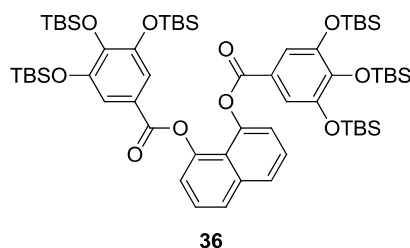


25

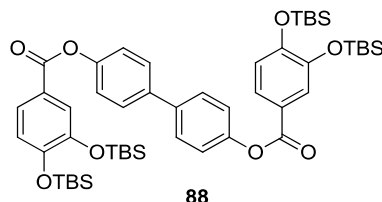
1,4-Bis[(3,4,5-tris(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoil)oxi]-2-naftoato de metilo (32). Se obtuvo a partir de 531 mg del cloruro de ácido **11b** y 88.5 mg de 1,4-dihidroxinaftoato de metilo. Cromatografía: DCM/hexano 3:7 (R_f 0.36). Rto: 41%; p.f. 259-261 °C; IR ν 1744 (C=O), 1576 (Ar), 1084 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.26 (s, 12H, 2Me₂SiO *para*), 0.34 (s, 24H, 4Me₂SiO *meta*), 1.03 (s, 18H, 2*t*-BuSiO *meta*), 1.04 (s, 18H, 2*t*-BuSiO *para*), 1.09 (s, 18H, 2*t*-BuSiO *para*), 7.56 (s, 2H, gal), 7.58 (s, 2H, gal), 7.61-7.71 (m, 2H naft), 8.04-8.07 (m, 2H, naft), 8.14-8.17 (m, 1H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.5, -3.4, -3.1, -2.8 (12CH₃ Me₂SiO), 19.0, 19.3 (6C *t*-BuSiO), 26.6, 26.7 (18CH₃ *t*-BuSiO), 52.7 (OCH₃), 116.7, 116.9 (4CH gal), 119.2 (CH naft), 119.7 (C naft), 121.1, 121.2 (2C gal), 122.2, 123.9, 128.1 (3CH naft), 129.3 (C naft), 129.5 (CH naft), 130.6 (C naft), 144.6, 144.7, 144.8 (2C gal, C naft), 146.6 (C naft), 149.1, 149.2 (4C gal), 164.9, 165.1, 165.2 (3C=O); ESI-MS 1229.6 (M + Na)⁺.



1,8-Bis([3,4,5-tris(benciloxi)benzoil]oxi)naftaleno (36). Se obtuvo a partir de 531 mg del cloruro de ácido **11b** y 84.3 mg de **18**. Cromatografía: DCM/hexano 6:4 (R_f 0.45). Rto: 24%; p.f. 286-287 °C; IR ν 1733 (C=O), 1579 (Ar), 1099 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.09 (s, 12H, Me₂SiO *para*), 0.23 (s, 24H, Me₂SiO *meta*), 0.94 (s, 36H, *t*-BuSiO *meta*), 0.99 (s, 18H, *t*-BuSiO *para*), 7.15 (dd, J = 7.5, 0.7, 2H naft), 7.26 (s, 4H gal), 7.50 (t, J = 7.9, 2H naft), 7.83 (dd, J = 8.3, 0.6, 2H naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.3, -3.1 (12CH₃ Me₂SiO), 18.8, 19.3 (6C *t*-BuSiO), 26.5, 26.7 (18CH₃ *t*-BuSiO), 116.1 (4CH gal), 116.1 (2CH naft), 120.5 (2CH naft), 121.0 (2C gal), 123.3 (C naft), 126.5, 127.1 (2CH naft), 136.9 (C naft), 143.8 (2C gal), 146.8 (2C naft), 148.6 (4C gal), 165.9 (2C=O); ESI-MS 1171.6 (M + Na)⁺.

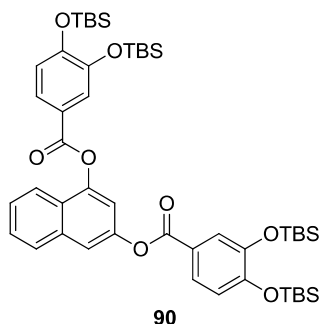


4,4'-Bis[(3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)benzoyl)oxy]-1,1'-bifenilo (88). Se obtuvo a partir de 524 mg del cloruro de ácido **86b** y 58 mg de 4,4'-dihidroxi-1,1'-bifenilo. Cromatografía: DCM/hexano 4:6 (R_f 0.36). Rto: 76%; p.f. 228-230 °C; IR ν 1732 (C=O), 1597 (Ar), 1192 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.28 (s, 12H, Me_2SiO), 0.29 (s, 12H, Me_2SiO), 1.04 (s, 36H, *t*-BuSiO), 6.96 (d, J = 8.4, 2H, protocatecuico), 7.28-7.32 (m, 4H, bifenilo), 7.63-7.66 (m, 4H, bifenilo), 7.72 (d, J = 2.1, 2H, protocatecuico), 7.77 (dd, J = 8.4, 2.2, 2H, protocatecuico); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.7 (8CH₃ Me_2SiO), 18.9 (4C *t*-BuSiO), 26.3 (12CH₃ *t*-BuSiO), 121.1 (2CH protocatecuico), 122.6 (2C protocatecuico), 122.9 (4CH bifenilo), 123.2, 124.8 (4CH protocatecuico), 128.6 (4CH bifenilo), 138.5 (2C bifenilo), 147.4 (2C protocatecuico), 151.0 (2C bifenilo), 152.8 (2C protocatecuico), 165.3 (2C=O); ESI-MS 937.6 (M + Na)⁺.

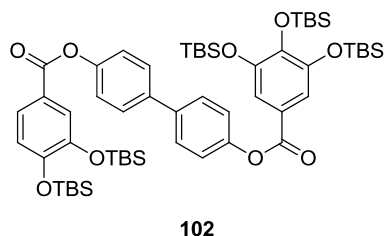


1,3-Bis[(3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)benzoyl)oxy]naftaleno (90). Se obtuvo a partir de 524 mg del cloruro de ácido **86b** y 58 mg de 1,3-dihidroxinaftaleno. Cromatografía: DCM/hexano 4:6 (R_f 0.36). Cromatografía: De hexano a DCM (R_f 0.56 en hexano:DCM 1:1). Rto: 63%; p.f. 216-218 °C; IR ν 1737 (C=O), 1599 (Ar), 1090 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.26 (s, 6H, Me_2SiO), 0.27 (s, 12H, 2 Me_2SiO), 0.28 (s, 6H, Me_2SiO), 1.02 (s, 18H, 2*t*-BuSiO), 1.02 (s, 9H, *t*-BuSiO), 1.03 (s, 9H, *t*-BuSiO), 6.96 (d, J = 8.4, 1H, protocatecuico), 6.97 (d, J = 8.4, 1H, protocatecuico), 7.36 (d, J = 2.2, 1H, naft), 7.60-7.42 (m, 2H, naft), 7.64 (d, J = 1.7, 1H, protocatecuico), 7.70 (d, J = 2.2, 1H, protocatecuico), 7.75 (dd, J = 8.4, 2.2, 1H, protocatecuico), 7.79 (d, J = 2.2, 1H, protocatecuico), 7.92-7.79 (m, 2H, naft), 7.97 (d, J = 7.7, 1H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -4.1, -4.0 (8CH₃ Me_2SiO), 18.5, 18.6 (4C *t*-BuSiO), 25.9 (12CH₃ *t*-BuSiO), 114.5, 116.7 (2CH naft), 120.7, 120.8 (2CH protocatecuico), 121.6 (CH naft), 122.1, 122.4 (2C protocatecuico),

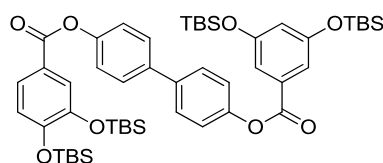
122.8, 122.8, 124.4, 124.6 (4CH protocatecuico), 125.3 (C naft), 126.1, 127.2, 127.9 (3CH naft), 134.35 (C naft), 147.0, 147.1 (2C protocatecuico), 147.6, 148.1 (2C naft), 152.5, 152.7 (2C protocatecuico), 164.5, 164.8 (2C=O); ESI-MS 911.5 (M + Na)⁺.



3,4,5-Tris(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoato de 4'-[(3,4-bis(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoil)oxi]-1,1'-bifenil-4-ilo (102). Se obtuvo a partir de 665 mg del cloruro de ácido **86b** y 513 mg de **95**. Cromatografía: DCM/hexano 7:3 (R_f 0.28). Rto: 88%; p.f. 204-206 °C; IR ν 1736 (C=O), 1576 (Ar), 1194 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.24 (s, 6H, Me₂SiO), 0.32 (s, 12H, Me₂SiO), 0.33 (s, 12H, Me₂SiO), 1.03 (s, 18H, *t*-BuSiO), 1.07 (s, 27H, *t*-BuSiO), 6.98 (d, *J* = 8.3, 1H, protocatecuico), 7.32-7.36 (m, 4H, bifenilo), 7.47 (s, 2H, gal), 7.65-7.68 (m, 4H, bifenilo), 7.76 (d, *J* = 1.9, 1H, protocatecuico), 7.80 (dd, *J* = 8.4, 1.8, 1H, protocatecuico); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ -3.7, -3.6, -3.4, -3.2 (10CH₃ Me₂SiO), 18.9, 19.0, 19.3 (5C *t*-BuSiO), 26.3, 26.4, 26.6, 26.7 (15CH₃ *t*-BuSiO), 116.5 (2CH gal), 121.1 (CH protocatecuico), 121.6 (C gal), 122.6 (4CH bifenilo), 123.0 (C protocatecuico), 123.2, 124.8 (2CH protocatecuico.), 128.6 (4CH bifenilo), 138.6 (2C bifenilo), 144.4 (C gal), 147.4 (C protocatecuico), 149.1 (2C gal), 151.1 (2C bifenilo), 152.8 (C protocatecuico), 165.3 (2C=O); ESI-MS 1067.5 (M + Na)⁺.

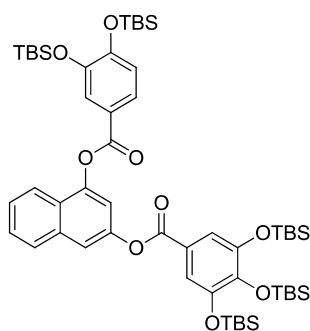


3,4-Bis(terc-butildimetilsililoxi)benzoato de 4'-[(3,5-bis(terc-butildimetilsililoxi)benzoil)oxi]-1,1'-bifenil-4-ilo (103). Se obtuvo a partir de 665 mg del cloruro de ácido **86b** y 415 mg de **96**. Cromatografía: DCM/hexano 7:3 (R_f 0.35). Rto: 87%; p.f. 160-163 °C; IR ν 1738 (C=O), 1592 (Ar), 1197 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.30 (s a, 24H, Me_2SiO), 1.05 (s a, 36H, $t\text{-BuSiO}$), 6.66 (t, J = 2.0, 1H, α -resorcílico), 6.98 (d, J = 8.4, 1H, protocatecuico), 7.31-7.36 (m, 6H, bifenilo, α -resorcílico), 7.65-7.68 (m, 4H, bifenilo), 7.75 (d, J = 2.0, 1H, protocatecuico), 7.79 (dd, J = 8.4, 2.0, 1H, protocatecuico); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.9, -3.7, -3.6 (8CH_3 Me_2SiO), 18.7, 18.9, 19.0 (4C $t\text{-BuSiO}$), 26.1, 26.3, 26.4 (12CH_3 $t\text{-BuSiO}$), 115.5, 117.9 (3CH α -resorcílico), 121.1 (CH protocatecuico), 122.5, 122.6 (4CH bifenilo), 123.0 (C protocatecuico), 123.2, 124.8 (2CH protocatecuico), 128.6 (4CH bifenilo), 131.6 (C α -resorcílico), 138.5, 138.7 (2C bifenilo), 147.4 (C protocatecuico), 150.9, 151.1 (2C bifenilo), 152.8 (C protocatecuico), 157.2 (2C α -resorcílico), 165.3 (2C=O); ESI-MS 937.4 (M + Na) $^+$.



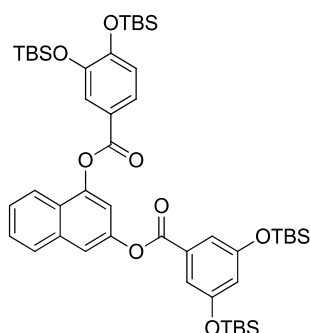
103

3,4,5-Tris(terc-butildimetilsililoxi)benzoato de 4'-[(3,4-bis(terc-butildimetilsililoxi)benzoil)oxi]-2-naftilo (105). Se obtuvo a partir de 665 mg del cloruro de ácido **86b** y 494 mg de **97**. Cromatografía: DCM/hexano 6:4 (R_f 0.39). Rto: 92%; ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.25 (s, 6H, Me_2SiO), 0.30 (s, 6H, Me_2SiO), 0.31 (s, 6H, Me_2SiO), 0.33 (s, 12H, Me_2SiO), 1.03 (s, 18H, $t\text{-BuSiO}$), 1.05 (s, 9H, $t\text{-BuSiO}$), 1.06 (s, 9H, $t\text{-BuSiO}$), 1.08 (s, 9H, $t\text{-BuSiO}$), 6.98 (d, J = 8.4, 1H, protocatecuico), 7.46 (d, J = 2.1, 1H, naft), 7.49-7.59 (m, 4H, gal, naft), 7.67 (d, J = 2.1, 1H, naft), 7.76 (d, J = 2.1, 1H, protocatecuico), 7.81 (dd, J = 8.3, 2.0, 1H, protocatecuico), 7.89 (dd, J = 7.1, 1.7, 1H, naft), 8.04 (d, J = 7.5, 1H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.6, -3.5, -3.3, -3.1 (10CH_3 Me_2SiO), 18.9, 19.0, 19.3 (5C $t\text{-BuSiO}$), 26.1, 26.3, 26.4, 26.6, 26.7 (15CH_3 $t\text{-BuSiO}$), 114.9 (CH naft), 116.6 (2CH gal), 117.1 (CH naft), 121.1 (CH protocatecuico), 121.2 (C gal), 121.9 (CH naft), 122.8 (C protocatecuico), 123.3, 124.9 (2CH protocatecuico), 125.7 (C naft), 126.5, 127.6, 128.3 (3CH naft), 134.8 (C naft), 144.7 (C gal), 147.4 (C protocatecuico), 147.9, 148.5 (2C naft), 149.2 (2C gal), 152.9 (C protocatecuico), 164.8, 165.2 (2C=O); ESI-MS 1018.5 (M + Na) $^+$.



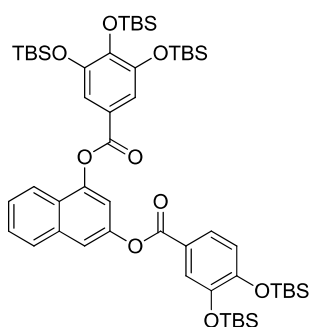
105

3,4-Bis(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoato de 3-[(3,5-bis(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoil)oxi]-1-naftilo (106). Se obtuvo a partir de 665 mg del cloruro de ácido **86b** y 395 mg de **99**. Cromatografía: DCM/hexano 7:3 (R_f 0.43). Rto: 85%; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 0.33 (s, 12H, Me_2SiO), 0.36 (s, 12H, Me_2SiO), 1.09 (s, 18H, *t*-BuSiO), 1.10 (s, 9H, *t*-BuSiO), 1.11 (s, 9H, *t*-BuSiO), 6.73 (t, $J = 2.3$, 1H, α -resorcílico), 7.06 (d, $J = 8.4$, 1H, protocatecuico), 7.45 (d, $J = 2.1$, 2H, α -resorcílico), 7.50 (d, $J = 2.1$, 1H, naft), 7.51-7.60 (m, 2H, naft), 7.73 (d, $J = 1.8$, 1H, naft), 7.91-7.97 (m, 3H, naft, protocatecuico), 8.08 (d, $J = 7.8$, 1H, naft); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ -4.4, -4.2, -4.1 (8CH_3 Me_2SiO), 18.1, 18.4 (4C *t*-BuSiO), 25.6, 25.8, 25.9 (12CH_3 *t*-BuSiO), 114.2 (CH naft), 115.0 (2CH α -resorcílico), 116.5 (CH naft), 117.5 (CH α -resorcílico), 120.7 (CH protocatecuico), 121.4 (C protocatecuico), 122.0 (CH naft), 122.7, 124.5 (2CH protocatecuico), 125.3 (C naft), 126.1, 127.2, 127.8 (3CH naft), 130.9 (C α -resorcílico), 134.2 (C naft), 147.0, 147.5, 147.8 (2C naft, C protocatecuico), 152.6 (C protocatecuico), 156.7 (2C α -resorcílico), 164.2, 164.6 (2C=O); ESI-MS 889.4 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.



106

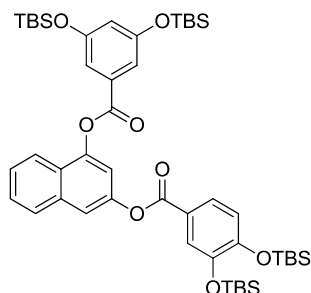
3,4,5-Tris(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoato de 3-[(3,4-bis(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoil)oxi]-1-naftilo (108). Se obtuvo a partir de 665 mg del cloruro de ácido **86b** y 494 mg de **98**. Cromatografía: DCM/hexano 7:3 (R_f 0.37). Rto: 82%; ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.27 (s, 6H, Me_2SiO), 0.35 (s, 12H, Me_2SiO), 0.36 (s, 12H, Me_2SiO), 1.06 (s, 18H, *t*-BuSiO), 1.10 (s, 27H, *t*-BuSiO), 7.05 (d, $J = 8.4$, 1H, protocatecuico), 7.47 (d, $J = 2.1$, 1H, naft), 7.52-7.58 (m, 3H, gal, naft), 7.71 (d, $J = 1.8$, 1H, naft), 7.89-7.95 (m, 4H, naft, protocatecuico), 8.05 (d, $J = 7.8$, 1H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -4.1, -4.0, -3.9, -3.6 (10CH_3 Me_2SiO), 18.4, 18.5, 18.8 (5C *t*-BuSiO), 25.8, 25.9, 26.1, 26.2 (15CH_3 *t*-BuSiO), 114.4 (CH naft), 116.1 (2CH gal), 116.6 (CH naft), 120.7 (CH protocatecuico), 121.0 (C gal), 121.5 (CH naft), 122.1 (C protocatecuico), 122.8, 124.5 (2CH protocatecuico), 125.2 (C naft), 126.0, 127.1, 127.8 (3CH naft), 134.3 (C naft), 144.0 (C gal), 147.0 (C protocatecuico), 147.5, 148.1 (2C naft), 148.6 (2C gal), 152.6 (C protocatecuico), 164.3, 164.6 (2C=O); ESI-MS 1018.5 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.



108

3,4-Bis(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoato de 4-[(3,5-bis(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoil)oxi]-2-naftilo (109). Se obtuvo a partir de 665 mg del cloruro de ácido **86b** y 395 mg de **100**. Cromatografía: DCM/hexano 7:3 (R_f 0.34). Rto: 86%; ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.27 (s, 18H, Me_2SiO), 0.28 (s, 6H, Me_2SiO), 1.03 (s, 36H, *t*-BuSiO), 6.67 (t, $J = 2.4$, 1H, α -resorcílico), 6.95 (d, $J = 8.4$, 1H, protocatecuico), 7.38 (d, $J = 2.1$, 2H, α -resorcílico), 7.42 (d, $J = 2.1$, 1H, naft), 7.48-7.58 (m, 2H, naft), 7.66 (d, $J = 2.1$, 1H, naft), 7.72 (d, $J = 2.1$, 1H, protocatecuico), 7.77 (dd, $J = 8.4$, 2.1, 1H, protocatecuico), 7.88 (d, $J = 7.8$, 1H, naft), 7.97 (d, $J = 7.8$, 1H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -4.4, -4.1, -4.0 (8CH_3 Me_2SiO), 18.2, 18.4, 18.5 (4C *t*-BuSiO), 25.6, 25.8, 25.9 (12CH_3 *t*-BuSiO), 114.4 (CH naft), 115.1 (2CH α -resorcílico), 116.8 (CH naft), 117.8 (CH α -resorcílico), 120.6 (CH protocatecuico), 121.4 (CH naft), 122.3 (C protocatecuico), 122.7, 124.4

(2CH protocatecuico), 125.1 (C naft), 126.1, 127.2, 127.9 (3CH naft), 130.7 (C α -resorcílico), 134.3 (C naft), 146.9, 147.3, 148.0 (2C naft, C protocatecuico), 152.5 (C protocatecuico), 156.9 (2C α -resorcílico), 164.4, 164.7 (2C=O); ESI-MS 889.4 (M + Na)⁺.

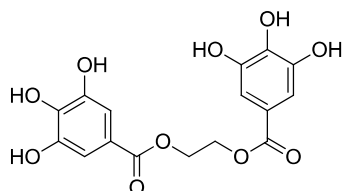


109

5.1.2.10. Síntesis de los diésteres finales **40-44**, **46**, **49**, **50**, **52**, **53**, **55**, **59** y **61**.

La desprotección de los intermedios bencilados se realizó siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.1.1.3. En el caso de los compuestos **49** y **50** la reacción de hidrogenación se prolongó durante 16 h.

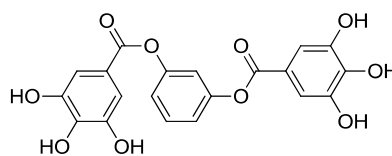
1,2-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]etano (40). Se obtuvo a partir de 250 mg de **20**. Rto: 95%; p.f. 90-92 °C; IR ν 3393, 1692, 1624, 1198; ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 4.53 (s, 4H, 2CH₂), 7.08 (s, 4H, gal); ¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ 63.9 (2CH₂), 110.3 (4CH gal), 121.3 (2C gal), 139.7 (2C gal), 146.6 (4C gal), 168.3 (2C=O); ESI-MS 364.7 (M - H)⁻.



40

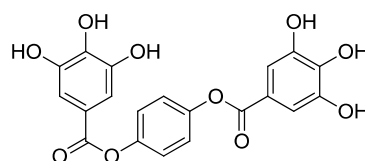
1,3-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]benceno (41). Se obtuvo a partir de 300 mg de **21**. Rto: 60%; p.f. 194-195 °C; IR ν 3370 (OH), 1718 (C=O), 1618 (Ar), 1200 (C-O); ¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) δ 7.06-7.14 (m, 3H, Ph), 7.20 (s, 4H, gal), 7.48 (t, J = 8.4, 1H, Ph); ¹³C-RMN (50 MHz, CD₃OD) δ 110.7 (4CH gal), 117.1 (CH Ph),

120.1, (2CH Ph), 120.1 (2C gal), 130.8 (CH Ph), 140.8, 146.8 (6C gal), 153.3 (2C Ph), 166.7 (2C=O); ESI-MS 412.8 (M – H)⁻.



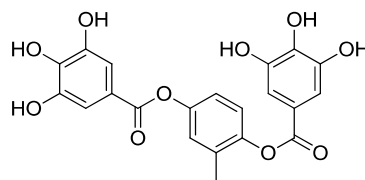
41

1,4-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]benceno (42). Se obtuvo a partir de 245 mg de **22**. Rto: 75%; p.f. 265 °C; IR ν 3421 (OH), 1697 (C=O), 1624 (Ar), 1177 (C-O); ¹H-RMN (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.05 (s, 4H, Ph o gal), 7.20 (s, 4H, Ph o gal); ¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 109.0 (4CH gal), 118.0 (2C gal), 122.8 (4CH Ph), 139.3, 145.6 (6C gal), 148.0 (2C Ph), 164.7 (2C=O); ESI-MS 437.0 (M + Na)⁺.



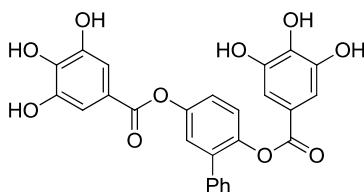
42

2-Metil-1,4-bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]benceno (43). Se obtuvo a partir de 470 mg de **23**. Rto: 67%; p.f. 256 °C (descompone); IR (KBr) ν 3385 (OH), 1692 (C=O), 1604 (Ar), 1209 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 2.31 (s, 3H, CH₃), 6.95 (dd, *J* = 8.6, 2.7, 1H, Ph), 7.01-7.06 (m, 2H, Ph), 7.10 (s, 2H, gal), 7.13 (s, 2H, gal); ¹³C-RMN (50 MHz, CD₃OD) δ 16.4 (CH₃), 110.7 (4CH gal), 120.4, 120.6 (2C gal), 121.3, 124.1, 125.2 (3CH Ph), 133.1 (C Ph), 140.6, 140.7, 146.7, 146.8 (6C gal), 148.6, 150.1 (2C Ph), 166.7, 167.0 (2C=O); ESI-MS 429.0 (M + H)⁺.



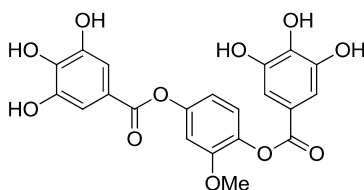
43

2,5-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]-1,1'-bifenilo (44). Se obteve a partir de 265 mg de **24**. Rto: 75%; p.f. 114-116 °C; IR (KBr) ν 3362 (OH), 1701 (C=O), 1616 (Ar), 1165 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) δ 7.06 (s, 2H, gal), 7.24 (s, 2H, gal), 7.15-7.38 (m, 6H, bifenilo), 7.46-7.49 (m, 2H, bifenilo); ^{13}C -RMN (50 MHz, CD_3OD) δ 110.6, 110.7 (4CH gal), 120.4, 120.5 (2C gal), 122.8, 124.9, 125.4, 128.9, 129.5, 130.0 (8CH bifenilo), 137.6, 138.2, 140.7 (2C bifenilo, 2C gal), 146.6, 146.8 (4C gal), 147.0, 150.4 (2C bifenilo), 166.9, 167.0 (2C=O); ESI-MS 488.6 (M – H) $^-$.



44

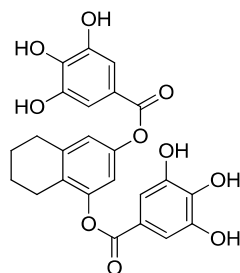
2-Metoxi-1,4-bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]benceno (46). Se obteve a partir de 235 mg de **26**. Rto: 85%; p.f. 194-195 °C; IR ν 3369 (OH), 1712 (C=O), 1616 (Ar), 1175 (C-O); ^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 3.70 (s, 3H, OCH_3), 6.79 (dd, J = 8.6, 2.5, 1H, Ph), 6.97 (d, J = 2.5, 1H, Ph), 7.14 (d, J = 8.6, 1H, Ph), 7.19 (s, 2H, gal), 7.21 (s, 2H, gal); ^{13}C -RMN (50 MHz, CD_3OD) δ 56.7 (OCH_3), 108.2 (CH Ph), 110.7, 110.8 (4CH gal), 114.7 (CH Ph), 120.5, 120.6 (2C gal), 124.2 (CH Ph), 139.1, 140.7 (C Ph, 2C gal), 146.7, 146.8 (4C gal), 151.0, 153.5 (2C Ph), 166.7, 167.0 (2C=O); ESI-MS 444.9 (M + H) $^+$.



46

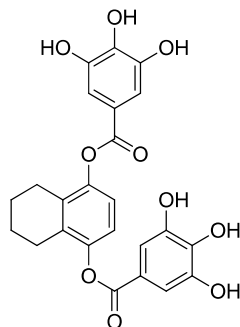
1,3-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]-5,6,7,8-tetrahidronaftaleno (49). Se obteve a partir de 245 mg de **30**. Rto: 92%; p.f. 213 °C (descompone); IR ν 3356 (OH), 1705 (C=O), 1615 (Ar), 1200 (C-O); ^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 1.80 (m, 4H, tetrahidronaft), 2.59 (m, 2H, tetrahidronaft), 2.83 (m, 2H, tetrahidronaft), 6.78 (d, J = 2.3, 1H, tetrahidronaft), 6.84 (d, J = 2.3, 1H, tetrahidronaft), 7.18 (s, 2H, gal), 7.21 (s, 2H, gal); ^{13}C -RMN (50 MHz, CD_3OD) δ 23.6, 23.8, 24.3, 30.6 (4CH $_2$

tetrahidronaft), 110.7 (4CH gal), 114.4 (CH tetrahidronaft), 120.4, 120.6 (2C gal), 120.8 (CH tetrahidronaft), 128.4 (C tetrahidronaft), 140.6, 140.7 (2C gal), 141.1 (C tetrahidronaft), 146.7, 146.8 (4C gal), 150.3, 151.0 (2C tetrahidronaft), 166.6, 167.0 (2C=O); ESI-MS 466.9 (M – H)⁻.



49

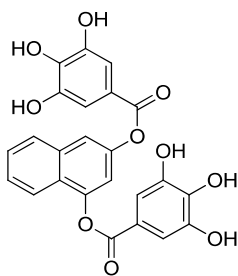
1,4-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]-5,6,7,8-tetrahidronaftaleno (50). Se obteve a partir de 214 mg de **31**. Rto: 88%; p.f. 206 °C (descompone); IR ν 3344 (OH), 1701 (C=O), 1612 (Ar), 1184 (C-O); ¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) δ 1.76 (m, 4H, tetrahidronaft), 2.62 (m, 4H, tetrahidronaft), 6.98 (s, 2H, tetrahidronaft), 7.22 (s, 4H, gal); ¹³C-RMN (50 MHz, CD₃OD) δ 23.1, 24.8 (4CH₂ tetrahidronaft), 110.6 (4CH gal), 120.5 (2C gal), 120.9 (2CH tetrahidronaft), 132.6 (2C tetrahidronaft), 140.6, 146.8 (6C gal), 148.4 (2C tetrahidronaft), 166.8 (2C=O); ESI-MS 466.9 (M – H)⁻.



50

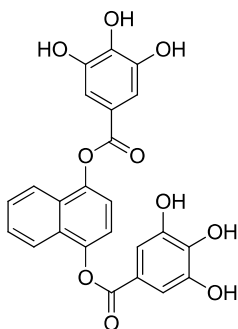
1,3-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]naftaleno (52). Se obteve a partir de 300 mg de **30**. Rto: 65%; p.f. 163-164 °C; IR ν 3385 (OH), 1709 (C=O), 1608 (Ar), 1198 (C-O); ¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) δ 7.18-7.27 (m, 3H, gal, naft), 7.34 (s, 2H, gal), 7.45-7.65 (m, 3H, naft), 7.88-7.96 (m, 2H, naft); ¹³C-RMN (50 MHz, CD₃OD) δ 109.7, 109.8 (4CH gal), 114.7, 116.8 (2CH naft), 119.1, 119.4 (2C gal), 121.4

(CH naft), 125.6 (C naft), 126.3, 127.4, 128.0 (3CH naft), 134.8 (C naft), 139.7, 139.9 (2C gal), 145.8, 145.9 (4C gal), 148.1, 148.6 (2C naft), 165.7, 165.9 (2C=O); ESI-MS 462.7 (M – H)⁻.



52

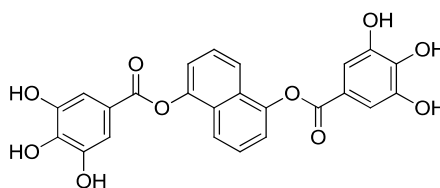
1,4-Bis[(3,4,5-trihidroxi benzoil)oxi]naftaleno (53). Se obtuvo a partir de 587 mg de **31**. Rto: 88%; p.f. 252 °C (descompone); IR ν 3406 (OH), 1718 (C=O), 1612 (Ar), 1196 (C-O); ¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) δ 7.24 (s, 4H, gal), 7.29 (s, 2H, naft), 7.46-7.51 (m, 2H, naft), 7.81-7.86 (m, 2H, naft); ¹³C-RMN (50 MHz, CD₃OD) δ 110.8 (4CH gal), 119.2 (2CH naft), 120.2 (2C gal), 122.8, 128.2 (4CH naft), 129.4 (2C naft), 140.9 (2C gal), 146.2, 146.9 (4C gal, 2C naft), 167.1 (2C=O). ESI-MS 486.9 (M + Na)⁺.



53

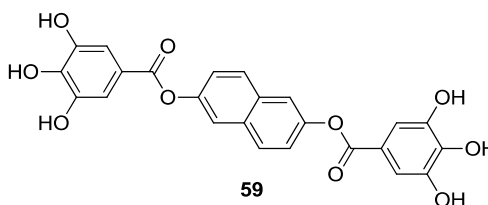
1,5-Bis[(3,4,5-trihidroxi benzoil)oxi]naftaleno (55). Se obtuvo a partir de 246 mg de **33**. Rto: 30%; p.f. 265 °C (descompone); IR ν 3404 (OH), 1718 (C=O), 1618 (Ar), 1209 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 7.35 (s, 4H, gal), 7.40 (d, J = 7.5, 2H, naft), 7.58 (t, J = 7.9, 2H, naft), 7.84 (d, J = 8.2, 2H, naft); ¹³C-RMN (50 MHz, DMSO-d₆) δ 109.2 (4CH gal), 117.5 (2CH naft), 119.3 (2C gal), 127.6, 127.8 (4CH

naft), 128.4 (2C naft), 139.6 (2C gal), 145.8 (2C naft), 146.7 (4C gal), 164.5 (2C=O); ESI-MS 462.7 (M – H)⁻.



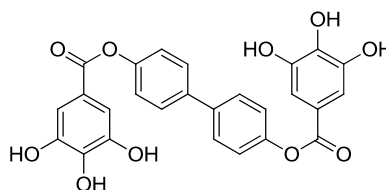
55

2,6-Bis[(3,4,5-trihidroxi benzoil)oxi]naftaleno (59). Se obteve a partir de 223 mg de **37**. Rto: 54%; p.f. 272 °C (descompone); IR ν 3415 (OH), 1712 (C=O), 1608 (Ar), 1205 (C-O); ¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD) δ 7.25 (s, 4H, gal), 7.36 (dd, J = 8.8, 2.2, 2H, naft), 7.71 (d, J = 2.2, 2H, naft), 7.90 (d, J = 8.8, 2H, naft); ¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ 109.6 (4CH gal), 118.8 (2CH naft), 119.5 (2C gal), 122.4, 129.0 (4CH naft), 132.2 (2C naft), 139.7, 145.7 (6C gal), 149.3 (2C naft), 166.1 (2C=O); ESI-MS 462.7 (M – H)⁻.



59

4,4'-Bis[(3,4,5-trihidroxi benzoil)oxi]-1,1'-bifenilo (61). Se obteve a partir de 256 mg de **39**. Rto: 70%; p.f. 268 °C (descompone); IR ν 3396 (OH), 1701 (C=O), 1608 (Ar), 1192 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 7.24 (s, 4H, gal), 7.24-7.28 (m, 4H, bifenilo), 7.67-7.71 (m, 4H, bifenilo); ¹³C-RMN (50 MHz, CD₃OD) δ 110.8 (4CH gal), 120.8 (2C gal), 123.5, 129.2 (8CH bifenilo), 139.4 (2C bifenilo), 140.6 (2C gal), 146.9 (4C gal), 152.4 (2C bifenilo), 167.2 (2C=O); ESI-MS 488.8 (M – H)⁻.

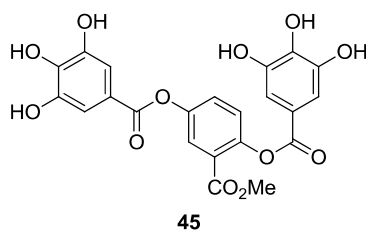


61

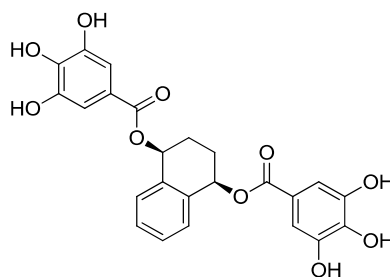
5.1.2.11. Síntesis de los diésteres finales **45**, **47**, **48**, **51**, **54**, **56-58**, **60**, **91-94** y **110-118**.

Procedimiento general. Una disolución del diéster intermedio correspondiente en THF (1.92 mL/mmol de grupo TBS) se hace reaccionar con un complejo de ácido fluorhídrico-piridina (0.96 mL/mmol de grupo TBS) en presencia de piridina (0.96 mL/mmol de grupo TBS). La reacción se mantiene a temperatura ambiente hasta la desaparición del producto de partida (c.c.f.) y a continuación se adiciona agua (50 mL/mmol de diéster). La reacción se extrae con acetato de etilo y los extractos orgánicos se lavan con una disolución saturada de CuSO₄, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose los diésteres finales que se purifican por recristalización de DCM/metanol.

2,5-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]-2-benzoato de metilo (45). Se obtuvo a partir de 215 mg de **25**. Rto: 70%; p.f. 193 °C (descompone); IR (neto) ν 3332 (OH), 1698 (C=O), 1615 (Ar), 1174 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, acetona-d₆) δ 3.73 (s, 3H, OCH₃), 7.30 (s, 4H, gal), 7.40 (d, *J* = 8.8, 1H, Ph), 7.58 (dd, *J* = 8.8, 2.9, 1H, Ph), 7.84 (d, *J* = 2.9, 1H, Ph), 8.25 (s a, 1H, OH), 8.30 (s a, 1H, OH), 8.36 (s a, 2H, OH), 8.40 (s a, 2H, OH); ¹³C-RMN (75 MHz, acetona-d₆) δ 52.6 (OCH₃), 110.6 (4CH gal), 120.4, 120.9 (2C gal), 125.4 (CH Ph), 125.6 (C Ph), 126.1, 128.2 (2CH Ph), 139.5, 139.8, 146.2, 146.3 (6C gal), 149.1, 149.4 (2C Ph), 164.9, 165.3, 165.5 (3C=O); ESI-MS 470.9 (M – H)[–].



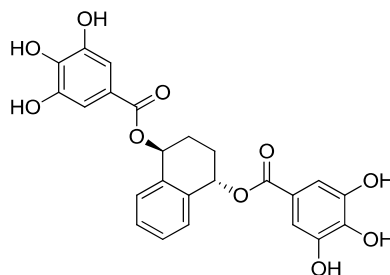
cis-1,4-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno (47). Se obtuvo a partir de 195 mg de **27**. Rto: 88%; p.f. 210 °C (descompone); IR ν 3353 (OH), 1684 (C=O), 1612 (Ar), 1229 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, acetona-d₆) δ 2.22-2.27 (m, 4H, tetrahidronaft), 6.15 (s, 2H, tetrahidronaft), 7.17 (s, 4H, gal), 7.36-7.45 (m, 4H, tetrahidronaft), 8.01, (s a, 2H, OH), 8.23 (s a, 4H, OH); ¹³C-RMN (75 MHz, acetona-d₆) δ 26.5 (2CH₂ tetrahidronaft), 70.4 (2CH tetrahidronaft), 110.0 (4CH gal), 121.9 (2C gal), 129.3, 129.5 (4CH tetrahidronaft), 138.9 (2C gal, 2C tetrahidronaft), 146.1 (4C gal), 166.4 (2C=O); ESI-MS 467.0 (M – H)[–].



47

(±)-*trans*-1,4-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno (48).

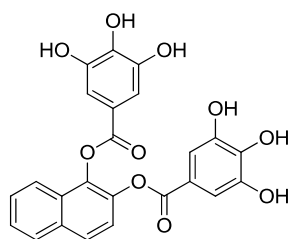
Se obteve a partir de 178 mg de **28**. Rto: 62%; p.f. 225 °C (descomponhe); IR ν 3351 (OH), 1683 (C=O), 1612 (Ar), 1214 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ 2.09–2.15 (m, 2H, tetrahidronaft), 2.43–2.47 (m, 2H, tetrahidronaft), 6.23 (s, 2H, tetrahidronaft), 7.12 (s, 4H, gal), 7.37–7.47 (m, 4H, tetrahidronaft), 8.07 (s a, 2H, OH), 8.20 (s a, 4H, OH); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, acetona- d_6) δ 25.8 (2CH₂ tetrahidronaft), 69.8 (2CH tetrahidronaft), 109.9 (4CH gal), 122.0 (2C gal), 129.6, 130.5 (4CH tetrahidronaft), 136.6, 139.9 (2C gal, 2C tetrahidronaft), 146.1 (4C gal), 166.2, 167.0 (2C=O); ESI-MS 467.0 (M – H)[–].



48

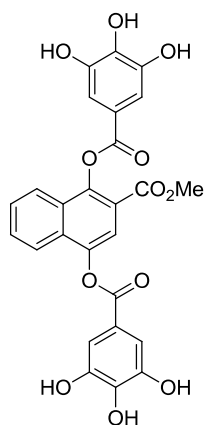
1,2-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]naftaleno (51). Se obteve a partir de 243 mg de **29**. Rto: 80%; p.f. 225 °C (descomponhe); IR ν 3338 (OH), 1738 (C=O), 1701 (Ar), 1614 (Ar), 1191 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ 7.21 (s, 2H, gal), 7.31 (s, 2H, gal), 7.55 (d, J = 9.0, 1H, naft), 7.56–7.63 (m, 2H, naft), 7.91–7.94 (m, 1H, naft), 7.95 (d, J = 8.7, 1H, naft), 8.02–8.05 (m, 1H, naft), 8.21 (s a, 1H, OH), 8.27 (s a, 1H, OH), 8.33 (s a, 2H, OH), 8.38 (s a, 2H, OH); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, acetona- d_6) δ 110.5, 110.6 (4CH gal), 119.9, 120.3 (2C gal), 122.1, 123.4, 127.0, 127.2, 127.9, 129.0 (6CH naft), 129.2, 133.2, 138.7 (3C naft), 139.7, 139.9 (2C

gal), 141.3 (C naft), 146.2, 146.3 (4C gal), 164.6, 164.8 (2C=O); ESI-MS 463.0 (M – H)[–].



51

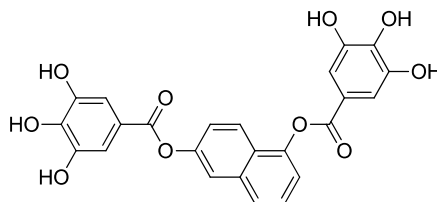
1,4-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]-2-naftoato de metilo (54). Se obteve a partir de 235 mg de **32**. Rto: 70%; p.f. 242 °C (descompone); IR ν 3428 (OH), 1733, 1699 (C=O), 1616 (Ar), 1192 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 3.80 (s, 3H, CH₃), 7.35 (s, 2H, gal), 7.36 (s, 2H, gal), 7.65-7.76 (m, 2H, naft), 7.87 (s, 1H, naft), 7.97-8.00 (m, 1H, naft), 8.09-8.12 (m, 1H, naft); ¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ 52.0 (OCH₃), 109.8, 109.9 (4CH gal), 118.6 (CH naft), 118.9, 119.2, 119.6 (2C gal, C naft), 121.8, 123.4, 128.1 (3CH naft), 129.1 (C naft), 129.5 (CH naft), 130.4 (C naft), 139.9, 140.0 (2C gal), 144.9 (C naft), 145.8, 145.9 (4C gal), 146.4 (C naft), 165.3, 165.7, 165.9 (3C=O); ESI-MS 520.8 (M – H)[–].



54

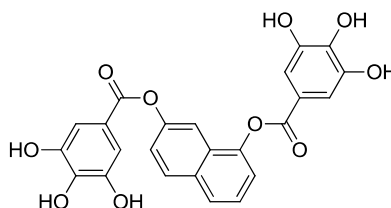
1,6-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]naftaleno (56). Se obteve a partir de 234 mg de **34**. Rto: 60%; p.f. 149-151 °C; IR ν 3400 (OH), 1719 (C=O), 1608 (Ar), 1200 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, acetona-*d*₆) δ 7.33 (s, 2H, gal), 7.40-7.43 (m, 3H, gal, naft), 7.48 (dd, *J* = 9.1, 2.3, 1H, naft), 7.62 (t, *J* = 7.9, 1H, naft), 7.86 (d, *J* = 2.2, 1H,

naft), 7.89 (d, $J = 8.4$, 1H, naft), 8.02 (d, $J = 2.2$, 1H, naft), 8.30 (s a, 1H, OH), 8.34 (s a, 1H, OH), 8.42 (s a, 2H, OH), 8.48 (s a, 2H, OH); ^{13}C -RMN (75 MHz, acetona- d_6) δ 110.0, 110.1 (4CH gal), 118.7, 119.3 (2CH naft), 120.0, 120.2 (2C gal), 122.8, 123.3 (2CH naft), 125.6 (C naft), 125.8, 127.0 (2CH naft), 135.7 (C naft), 139.2, 139.3, 145.8, 145.9 (6C gal), 147.8, 150.1 (2C naft), 165.0 (2C=O); ESI-MS 462.8 ($M - H$) $^-$.



56

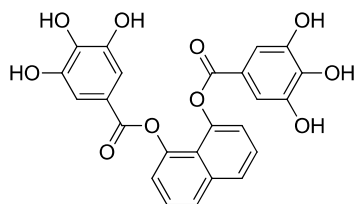
1,7-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]naftaleno (57). Se obteve a partir de 210 mg de **35**. Rto: 69%; p.f. 256 °C (descompone); IR ν 3346 (OH), 1696 (C=O), 1615 (Ar), 1199 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, acetona- d_6) δ 7.28 (s, 2H, gal), 7.40 (s, 2H, gal), 7.46 (dd, $J = 7.6$, 0.9, 1H, naft), 7.50 (dd, $J = 7.6$, 2.3, 1H, naft), 7.59 (t, $J = 7.9$, 1H, naft), 7.77 (d, $J = 1.7$, 1H, naft), 7.93 (d, $J = 8.2$, 1H, naft), 8.10 (d, $J = 8.9$, 1H, naft), 8.26 (s a, 1H, OH), 8.29 (s a, 1H, OH), 8.36 (s a, 2H, OH), 8.41 (s a, 2H, OH); ^{13}C -RMN (75 MHz, acetona- d_6) δ 110.0, 110.1 (4CH gal), 112.9, 119.7 (2CH naft), 120.0, 120.2 (2C gal), 123.0, 125.8, 126.0 (3CH naft), 128.2 (C naft), 130.0 (CH naft), 133.0 (C naft), 139.2, 145.7, 145.9 (6C gal), 147.4, 150.2 (2C naft), 164.9 (2C=O); ESI-MS 487.0 ($M + H$) $^+$.



57

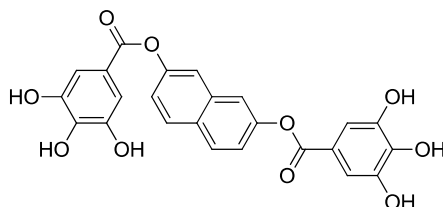
1,8-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]naftaleno (58). Se obteve a partir de 223 mg de **36**. Rto: 78%; p.f. 209 °C (descompone); IR ν 3452 (OH), 1694 (C=O), 1615 (Ar), 1226 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, acetona- d_6) δ 7.00 (s, 4H, gal), 7.23 (d, $J = 7.5$, 2H, naft), 7.58 (t, $J = 8.0$, 2H, naft), 7.94 (d, $J = 8.3$, 2H, naft); ^{13}C -RMN (75

MHz, acetona- d_6) δ 109.9 (4CH gal), 120.1 (2C gal, C naft), 121.0, 126.5, 127.7 (6CH naft), 137.2 (C naft), 138.5 (2C gal), 145.1 (4C gal), 146.9 (2C naft), 165.6 (2C=O); ESI-MS 463.0 ($M - H$)⁻.



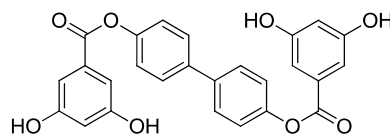
58

2,7-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]naftaleno (60). Se obtuvo a partir de 235 mg de **38**. Rto: 55%; p.f. 273 °C (descompone); IR ν 3389 (OH), 1687 (C=O), 1610 (Ar), 1146 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 7.26 (s, 4H, gal), 7.35 (dd, J = 8.9, 2.1, 2H, naft), 7.70 (d, J = 2.1, 2H, naft), 7.99 (d, J = 8.9, 2H, naft); ¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ 109.6 (4CH gal), 118.6 (2CH naft), 119.5 (2C gal), 121.5, 129.3 (4CH naft), 129.8, 134.9 (2C naft), 139.6, 145.7 (6C gal), 150.0 (2C naft), 166.1(2C=O); ESI-MS 487.0 ($M + Na$)⁺.



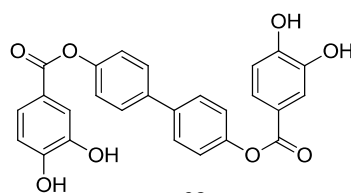
60

4,4'-Bis[(3,5-dihidroxibenzoil)oxi]-1,1'-bifenilo (91). Se obtuvo a partir de 250 mg de **87**. Rto: 65%; p.f. 272 °C (descompone); IR ν 3328 (OH), 1733, 1702 (C=O), 1604 (Ar), 1161 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 6.57 (t, J = 2.3, 2H, α -resorcílico), 7.11 (d, J = 2.3, 4H, J = 2.3), 7.29-7.32 (m, 4H, bifenilo), 7.71-7.74 (m, 4H, bifenilo); ¹³C-RMN (50 MHz, CD₃OD) δ 109.1 (2CH α -resorcílico), 109.4 (4CH α -resorcílico), 123.3, 129.1 (8CH bifenilo), 132.4 (2C α -resorcílico), 139.5 (2C bifenilo), 152.1 (2C bifenilo), 160.1 (4C α -resorcílico), 167.2 (2C=O); ESI-MS 456.9 ($M - H$)⁻.



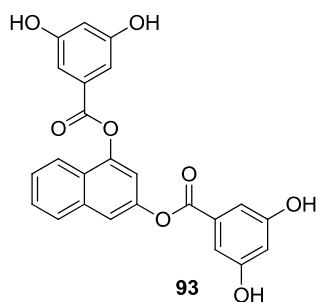
91

4,4'-Bis[(3,4-dihidroxi benzoil)oxi]-1,1'-bifenilo (92). Se obtuvo a partir de 230 mg de **88**. Rto: 60%; p.f. 286 °C (descompone); IR ν 3295 (OH), 1693 (C=O), 1610 (Ar), 1217; 1200 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 6.90 (d, $J = 8.7$, 2H, protocatecuico), 7.33 (d, $J = 8.5$, 4H, bifenilo), 7.51-7.53 (m, 4H, protocatecuico), 7.75 (d, $J = 8.6$, 4H, bifenilo), 9.51 (s a, 2H, OH), 9.99 (s a, 2H, OH); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 115.9, 117.1 (4CH protocatecuico), 119.8 (2C protocatecuico), 122.9 (4CH bifenilo), 123.0 (2CH protocatecuico), 128.1 (4CH bifenilo), 137.3 (2C bifenilo), 145.8 (2C protocatecuico), 150.8 (2C bifenilo), 151.7 (2C protocatecuico), 164.8 (2C=O); ESI-MS 456.9 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.

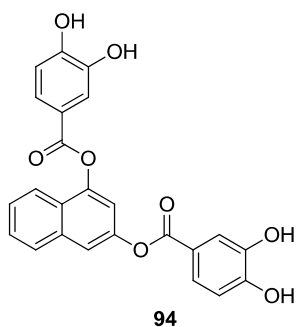


92

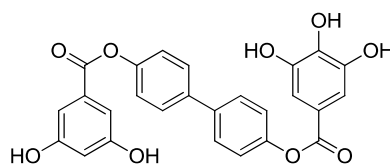
1,3-Bis[(3,5-dihidroxi benzoil)oxi]-naftaleno (93). Se obtuvo a partir de 140 mg de **89**. Rto: 52%; p.f. 167-169 °C; IR ν 3386 (OH), 1710 (C=O), 1603 (Ar), 1166 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 6.58 (t, $J = 2.3$, 1H, α -resorcílico), 6.62 (t, $J = 2.3$, 1H, α -resorcílico), 7.15 (d, $J = 2.3$, 2H, α -resorcílico), 7.23 (d, $J = 2.4$, 2H, α -resorcílico), 7.34 (d, $J = 2.2$, 1H, naft), 7.54-7.60 (m, 2H, naft), 7.71 (d, $J = 2.0$, 1H, naft), 7.90-7.99 (m, 2H, naft); $^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CD_3OD) δ 109.0 (2CH α -resorcílico), 109.3 (4CH α -resorcílico), 115.4, 117.9, 122.2 (3CH naft), 126.4 (C naft), 127.4, 128.4, 128.9 (3CH naft), 131.7, 132.1 (2C α -resorcílico), 135.7, 148.8, 149.3 (3C naft), 160.0, 160.1 (4C α -resorcílico), 166.3, 166.5 (2C=O); ESI-MS 454.8 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.



1,3-Bis[(3,4-dihidroxi benzoil)oxi]-naftaleno (94). Se obteve a partir de 168 mg de **90**. Rto: 26%; p.f. 79-81 °C; IR ν 3423 (OH), 1712 (C=O), 1603 (Ar), 1126 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) δ 6.90 (d, J = 8.2, 1H, protocatecuico), 6.94 (d, J = 8.3, 1H, protocatecuico), 7.29 d (d, J = 2.1, 1H, naft), 7.50-7.75 (m, 7H, naft, protocatecuico), 7.89-7.97 (m, 2H, naft); ^{13}C -RMN (50 MHz, CD_3OD) δ 115.8 (CH naft), 116.2, 116.4, 117.9, 118.0 (4CH protocatecuico, CH naft), 121.3, 121.6 (2C protocatecuico), 122.4 (CH naft), 124.6, 124.7 (2CH protocatecuico), 126.6 (2C naft), 127.4, 128.4, 129.0 (3CH naft), 135.8 (C naft), 146.5, 146.7 (2C protocatecuico), 149.1, 149.6 (2C naft), 152.7, 152.9 (2C protocatecuico), 166.6, 166.7 (2C=O); ESI-MS 454.9 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.

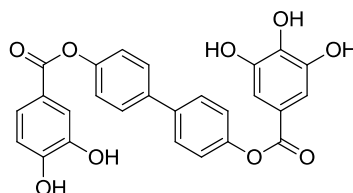


3,4,5-Trihidroxibenzoato de 4'-[(3,5-dihidroxi benzoil)oxi]-1,1'-bifenil-4-ilo (110). Se obteve a partir de 210 mg de **101**. Rto: 83%; p.f. 238-243 °C; IR ν 3300 (OH), 1730 (C=O), 1608 (Ar), 1192 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, acetona- d_6) δ 6.69 (t, J = 2.2, 1H, α -resorcilico), 7.20 (d, J = 2.3, 2H, α -resorcilico), 7.31 (s, 2H, gal), 7.33-7.40 (m, 4H, bifenilo), 7.74-7.78 (m, 4H, bifenilo); ^{13}C -RMN (75 MHz, acetona- d_6) δ 108.6, 109.2 (3CH α -resorcilico), 110.5 (2CH gal), 120.9 (C gal), 123.2, 123.3, 128.7, 128.8 (8CH bifenilo), 132.4 (C α -resorcilico), 138.5, 138.8 (2C bifenilo), 139.4 (C gal), 146.2 (2C gal), 151.7, 151.9 (2C bifenilo), 159.6 (2C α -resorcilico), 165.4 (2C=O); ESI-MS 473.1 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.



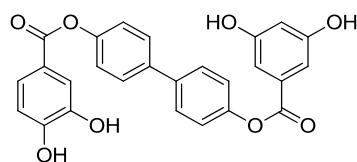
110

3,4,5-Trihidroxibenzoato de 4'-[(3,4-dihidroxibenzoil)oxi]-1,1'-bifenil-4-ilo (111). Se obtuvo a partir de 183 mg de **102**. Rto: 79%; p.f. 221 °C (descompone); IR ν 3332 (OH), 1733 (C=O), 1608 (Ar), 1193 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, acetona- d_6) δ 7.00 (d, J = 8.1, 1H, protocatecuico), 7.31 (s, 2H, gal), 7.33-7.37 (m, 4H, bifenilo), 7.65 (dd, J = 8.2, 2.1, 1H, protocatecuico), 7.68 (d, J = 1.8, 1H, protocatecuico), 7.74-7.77 (m, 4H, bifenilo), 8.44 (s a, 5H, OH); ^{13}C -RMN (75 MHz, acetona- d_6) δ 110.5 (2CH gal), 116.1, 117.7 (2CH protocatecuico), 120.9 (C gal), 122.0 (C protocatecuico), 123.3 (4CH bifenilo), 124.2 (CH protocatecuico), 128.7 (4CH bifenilo), 138.5, 138.6 (2C bifenilo), 139.6 (C gal), 145.9 (C protocatecuico), 146.3 (2C gal), 151.6 (C protocatecuico), 151.9, 152.0 (2C bifenilo), 165.3, 165.5 (2C=O); ESI-MS 473.1 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.



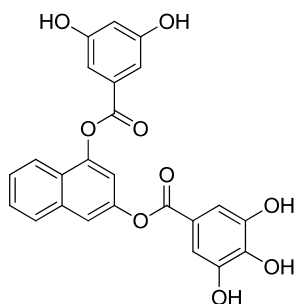
111

3,4-Dihidroxibenzoato de 4'-[(3,5-dihidroxibenzoil)oxi]-1,1'-bifenil-4-ilo (112). Se obtuvo a partir de 160 mg de **103**. Rto: 85%; p.f. 185-188 °C; IR ν 3373 (OH), 1703 (C=O), 1609 (Ar), 1198 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, acetona- d_6) δ 6.68 (t, J = 2.2, 1H, α -resorcílico), 7.01 (d, J = 8.1, 1H, protocatecuico), 7.20 (d, J = 2.2, 2H, α -resorcílico), 7.32-7.36 (m, 4H, bifenilo), 7.66 (dd, J = 8.1, 2.1, 1H, protocatecuico), 7.68 (d, J = 1.8, 1H, protocatecuico), 7.74-7.77 (m, 4H, bifenilo), 8.35 (s a, 1H, OH), 8.52 (s a, 1H, OH), 8.77 (s a, 2H, OH); ^{13}C -RMN (75 MHz, acetona- d_6) δ 108.6, 109.2 (3CH α -resorcílico), 116.1, 117.7 (2CH protocatecuico), 122.0 (C protocatecuico), 123.3 (4CH bifenilo), 124.2 (CH protocatecuico), 128.7 (4CH bifenilo), 132.4 (C α -resorcílico), 138.5, 138.6 (2C bifenilo), 145.9 (C protocatecuico), 151.6 (C protocatecuico), 151.9, 152.0 (2C bifenilo), 159.6 (2C α -resorcílico), 165.3, 165.5 (2C=O); ESI-MS 457.1 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.



112

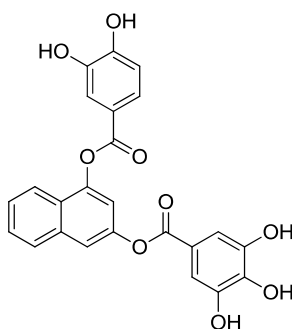
3,4,5-Trihidroxibenzoato de 4-[(3,5-dihidroxibenzoil)oxi]-2-naftilo (113). Se obtuvo a partir de 121 mg de **104**. Rto: 84%; p.f. 176-178 °C; IR ν 3364 (OH), 1695 (C=O), 1605 (Ar), 1194 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ 6.73 (t, $J = 2.3$, 1H, α -resorcílico), 7.31 (d, $J = 2.3$, 2H, α -resorcílico), 7.34 (s, 2H, gal), 7.47 (d, $J = 2.1$, 1H, naft), 7.55-7.65 (m, 2H, naft), 7.76 (d, $J = 1.9$, 1H, naft), 7.96- 8.04 (m, 2H, naft), 8.26 (s a, 1H, OH), 8.39 (s a, 2H, OH), 8.78 (s a, 2H, OH); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, acetona- d_6) δ 109.1, 109.4 (3CH α -resorcílico), 110.6 (2CH gal), 115.9, 117.8 (2CH naft), 120.7 (C gal), 122.2 (CH naft), 126.0 (C naft), 127.2, 128.3, 128.8 (3CH naft), 131.9 (C α -resorcílico), 135.4 (C naft), 139.8 (C gal), 146.3 (2C gal), 148.5, 149.4 (2C naft), 159.9 (2C α -resorcílico), 165.3, 165.4 (2C=O); ESI-MS 447.0 (M – H) $^-$.



113

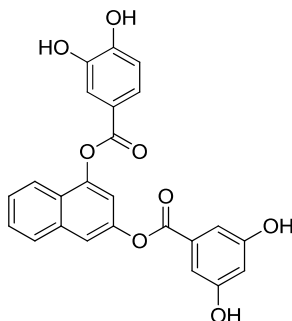
3,4,5-Trihidroxibenzoato de 4-[(3,4-dihidroxibenzoil)oxi]-2-naftilo (114). Se obtuvo a partir de 240 mg de **105**. Rto: 78%; p.f. 140 °C (descompone); IR ν 3401 (OH), 1709 (C=O), 1606 (Ar), 1200 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ 7.02 (d, $J = 8.7$, 1H, protocatecuico), 7.42 (s, 2H, gal), 7.43 (d, $J = 2.2$, naft), 7.57-7.63 (m, 2H, naft), 7.68-7.71 (m, 2H, protocatecuico), 7.76 (d, $J = 2.0$, 1H, naft), 7.97 (d, $J = 7.9$, 1H, naft), 8.02 (d, $J = 7.3$, 1H, naft), 8.33 (s a, 1H, OH), 8.47 (s a, 2H, OH), 8.52 (s a, 1H, OH), 8.87 (s a, 1H, OH); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, acetona- d_6) δ 110.7 (2CH gal), 115.9, 116.2, 117.7, 117.8 (2CH naft, 2CH protocatecuico), 120.4 (C gal), 121.8 (C protocatecuico), 122.3 (CH naft), 124.3 (CH protocatecuico), 126.2 (C naft), 127.1, 128.2, 128.8 (3CH naft), 135.3 (C naft), 140.0 (C gal), 146.3, 146.5

(2C gal, C protocatecuico), 148.8, 149.4 (2C naft), 151.8 (C protocatecuico), 165.2, 165.3 (2C=O); ESI-MS 447.0 (M – H)⁻.



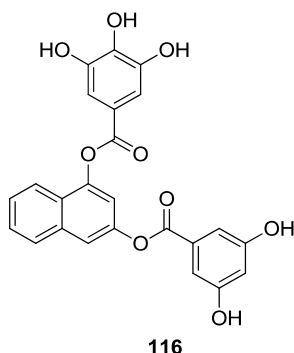
114

3,4-Dihidroxibenzoato de 3-[(3,5-dihidroxibenzoil)oxi]-1-naftilo (115). Se obtuvo a partir de 167 mg de **106**. Rto: 85%; p.f. 252 °C (descompone); IR ν 3310 (OH), 1741, 1699 (C=O), 1605 (Ar), 1209 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, acetona-*d*₆) δ 6.60 (t, *J* = 2.3, 1H, α -resorcílico), 6.88 (d, *J* = 8.6, 1H, protocatecuico), 7.17 (d, *J* = 2.3, 2H, α -resorcílico), 7.35 (d, *J* = 2.2, 1H, naft), 7.40-7.53 (m, 2H, naft), 7.54-7.57 (m, 2H, protocatecuico), 7.65 (d, *J* = 2.2, 1H, naft), 7.75-7.87 (m, 1H, naft), 7.87-7.93 (m, 1H, naft); ¹³C-RMN (75 MHz, acetona-*d*₆) δ 109.0, 109.3 (3CH α -resorcílico), 115.9, 116.1, 117.7, 117.8 (2CH naft, 2CH protocatecuico), 121.8 (C protocatecuico), 122.2 (CH naft), 124.4 (CH protocatecuico), 126.0 (C naft), 127.2, 128.3, 128.8 (3CH naft), 131.9 (C α -resorcílico), 135.3 (C naft), 145.9 (C protocatecuico), 148.5, 149.4 (2C naft), 151.7 (C protocatecuico), 159.9 (2C α -resorcílico), 165.3 (2C=O); ESI-MS 431.0 (M – H)⁻.

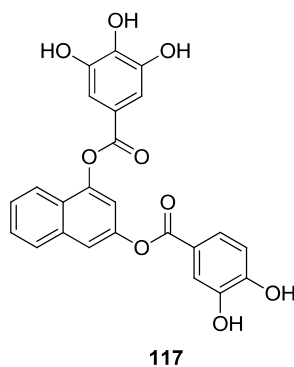


115

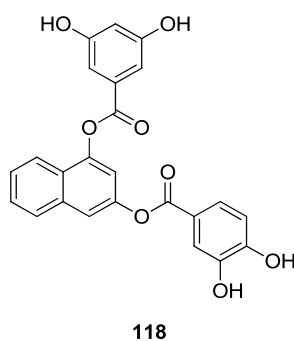
3,4,5-Trihidroxibenzoato de 3-[(3,5-dihidroxibenzoil)oxi]-1-naftilo (116). Se obtuvo a partir de 160 mg de **107**. Rto: 91%; p.f. 175-177 °C; IR ν 3367 (OH), 1698 (C=O), 1605 (Ar), 1197 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ 6.70 (t, J = 2.2, 1H, α -resorcílico), 7.23 (d, J = 2.2, 1H, naft), 7.43 (s, 2H, gal), 7.47 (d, J = 2.1, 1H, naft), 7.56-7.66 (m, 2H, naft), 7.97-8.04 (m, 2H, naft), 8.35 (s a, 1H, OH), 8.47 (s a, 2H, OH), 8.75 (s a, 2H, OH); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, acetona- d_6) δ 108.8, 109.2 (3CH α -resorcílico), 110.6 (2CH gal), 115.7, 117.5 (2CH naft), 120.4 (C gal), 122.3 (CH naft), 126.3 (C naft), 127.2, 128.2, 128.8 (3CH naft), 132.2 (C α -resorcílico), 135.3 (C naft), 139.8 (C gal), 146.4 (2C gal), 148.8, 149.2 (2C naft), 159.7 (2C α -resorcílico), 165.4 (2C=O); ESI-MS 447.1 (M – H) $^-$.



3,4,5-Trihidroxibenzoato de 3-[(3,4-dihidroxibenzoil)oxi]-1-naftilo (117). Se obtuvo a partir de 143 mg de **108**. Rto: 83%; p.f. 148 °C (descompone); IR ν 3324 (OH), 1703 (C=O), 1607 (Ar), 1202 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ 7.05 (d, J = 8.8, 1H, protocatecuico), 7.33 (s, 2H, gal), 7.43 (d, J = 2.2, 1H, naft), 7.51-7.67 (m, 2H, naft), 7.75 (d, J = 2.0, 1H, naft), 7.66-7.81 (m, 2H, protocatecuico), 7.92-8.06 (m, 2H, naft), 8.32 (s a, 1H, OH), 8.45 (s a, 2H, OH), 8.61 (s a, 1H, OH), 8.95 (s a, 1H, OH); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, acetona- d_6) δ 110.6 (2CH gal), 115.9, 116.3, 117.6, 117.8 (2CH naft, 2CH protocatecuico), 120.7 (C gal), 121.5 (C protocatecuico), 122.3 (CH naft), 124.5 (CH protocatecuico), 126.2 (C naft), 127.1, 128.2, 128.8 (3CH naft), 135.3 (C naft), 139.8 (C gal), 146.1, 146.3 (2C gal, C protocatecuico), 148.8, 149.5 (2C naft), 152.0 (C protocatecuico), 165.2, 165.4 (2C=O); ESI-MS 447.0 (M – H) $^-$.



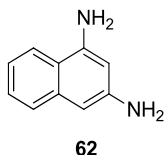
3,4-Dihidroxibenzoato de 4-[(3,5-dihidroxibenzoil)oxi]-2-naftilo (118). Se obteve a partir de 187 mg de **109**. Rto: 92%; p.f. 254 °C (descompone); IR ν 3315 (OH), 1702 (C=O), 1605 (Ar), 1219 (C-O); $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, acetona- d_6) δ 6.70 (t, $J = 2.1$, 1H, α -resorcílico), 7.06 (d, $J = 8.7$, 1H, protocatecuico), 7.22 (d, $J = 2.1$, 2H, α -resorcílico), 7.47 (d, $J = 2.1$, 1H, naft), 7.55-7.65 (m, 2H, naft), 7.77-7.80 (m, 3H, naft, protocatecuico), 7.98 (d, $J = 8.1$, 1H, naft), 8.02 (d, $J = 7.5$, 1H, naft), 8.60 (s a, 1H, OH), 8.78 (s a, 2H, OH), 8.95 (s a, 1H, OH); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, acetona- d_6) δ 108.4, 108.8 (3CH α -resorcílico), 115.2, 116.8, 117.1, 117.3 (2CH naft, 2CH protocatecuico), 120.9 (C protocatecuico), 121.9 (CH naft), 124.0 (CH protocatecuico), 125.8 (C naft), 126.7, 127.8, 128.3 (3CH naft), 131.7 (C α -resorcílico), 134.8 (C naft), 145.6 (C protocatecuico), 148.3, 148.7 (2C naft), 151.5 (C protocatecuico), 159.9 (2C α -resorcílico), 164.6, 164.9 (2C=O); ESI-MS 431.0 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.



5.1.3. Síntesis de los compuestos finales **65** y **66**.

5.1.3.1. Síntesis de **1,3-diaminonaftaleno (62)**.

A una disolución de 1.00 g de 1,3-dinitronaftaleno en 20 mL de metanol se le añade paladio sobre carbono al 10% (200 mg/mmol) y la mezcla se hidrogena a temperatura ambiente, con una presión inicial de hidrógeno de 50 psi, hasta la completa desaparición del producto de partida (c.c.f., 4 h). Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se filtra sobre celita y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna usando como eluyente DCM, aislándose 297 mg (Rto: 41%) de **62** en forma de aceite.⁷⁰ IR ν 3356 (NH₂), 1659, 1621 (Ar); ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.99 (s a, 2H, NH₂), 5.42 (s a, 2H, NH₂), 6.11-6.12 (m, 2H, 2CH), 6.91 (t, *J* = 7.5, 1H, CH), 7.15 (t, *J* = 7.5, 1H, CH), 7.30 (d, *J* = 8.2, 1H, CH), 7.76 (d, *J* = 8.2, 1H, CH); ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 96.5, 99.4 (2CH), 117.2 (C), 118.7, 122.1, 125.1, 125.5 (4CH), 136.2 (C), 145.1, 147.3 (2C-N).

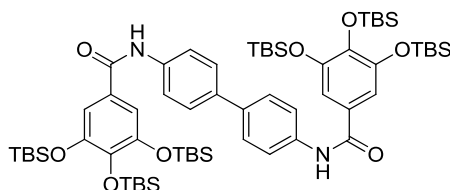


5.1.3.2. Síntesis de las diamidas intermedias **63** y **64**.

Procedimiento general. Se disuelve la diamina correspondiente (1 equivalente) y TEA (3 equivalentes), en DCM (10 mL/mmol de diamina) y se añade el cloruro de ácido **11b** (3 equivalentes) disuelto en DCM anhidro (2 mL/mmol de diamina). La reacción se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante toda la noche. La mezcla de reacción se lava con NaHCO₃ saturado y agua, se seca sobre Na₂SO₄ y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando el eluyente adecuado, obteniéndose la diamida correspondiente como un sólido blanco.

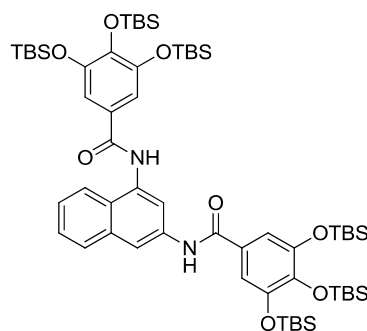
4,4'-Bis[(3,4,5-tris(*tert*-butildimetilsililo)benzoil)amino]-1,1'-bifenilo (63). Se obtuvo a partir de 59 mg de bencidina. Cromatografía: hexano → DCM (R_f 0.6, hexano/DCM 1:1). Rto: 82%; p.f. 140-141 °C; IR ν 3307 (NH), 1654 (C=O), 1572 (Ar), 1087 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.18 (s, 12H, 2Me₂Si *para*), 0.28 (s, 24H, 4Me₂Si *meta*), 0.99 (s, 36H, *t*-BuSiO *meta*), 1.03 (s, 18H, *t*-BuSiO *para*), 7.09 (s, 4H, gal), 7.57 (d, *J* = 8.6, 4H, bifenilo), 7.70 (d, *J* = 8.6, 4H, bifenilo), 7.84 (s a,

2H, 2NH); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.5, -3.2 (12 CH_3 Me_2SiO), 18.9, 19.2 (6C *t*-BuSiO), 26.6 (18 CH_3 *t*-BuSiO), 113.7 (4CH gal), 120.8 (4CH bifenilo), 127.4 (2C gal), 127.7 (4CH bifenilo), 136.9, 137.7 (4C bifenilo), 142.7 (2C gal), 149.3 (4C gal), 165.7 (2C=O); ESI-MS 1195.6 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.



63

1,3-Bis[(3,4,5-tris(*tert*-butildimetilsililoxi)benzoyl)amino]naftaleno (64). Se obtuvo a partir de 51 mg de la diamina **62**. Cromatografía: hexano \rightarrow DCM (R_f 0.7, hexano/DCM 1:1). Rto: 33%; p.f. 170-172 $^\circ\text{C}$; IR ν 3307 (NH), 1661 (C=O), 1572, 1535, 1477 (Ar); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 0.17 (s, 6H, Me_2SiO *para*), 0.18 (s, 6H, Me_2SiO *para*), 0.26 (s, 12H, 2 Me_2SiO *meta*), 0.29 (s, 12H, 2 Me_2SiO *meta*), 0.97 (s, 18H, 2*t*-BuSiO *meta*), 0.99 (s, 18H, 2*t*-BuSiO *meta*), 1.01 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 1.02 (s, 9H, *t*-BuSiO *para*), 7.06 (s, 2H, gal), 7.15 (s, 2H, gal), 7.43-7.56 (m, 2H, naft), 7.75-7.83 (m, 2H, naft, NH), 7.89 (dd, $J = 7.8, 1.5$, 1H, naft), 8.15-8.23 (m, 2H, naft, NH), 8.48 (d, $J = 1.2$, 1H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ -3.8, -3.7 (4 CH_3 Me_2SiO *para*), -3.5, -3.4 (8 CH_3 Me_2SiO *meta*), 18.6, 18.7 (2C *t*-BuSiO *para*), 18.9, 19.0 (4C *t*-BuSiO *meta*), 26.3 (3 CH_3 *t*-BuSiO *para*), 26.4 (15 CH_3 *t*-BuSiO *meta*, *t*-BuSiO *para*), 113.3 (2CH gal, CH naft), 113.5 (2CH gal), 114.4, 119.6 (2CH naft), 123.7 (C naft), 125.5 (CH naft), 126.8 (C gal), 126.9 (CH naft), 127.2 (C gal), 129.3 (CH naft), 133.4, 134.9, 135.5 (3C naft), 142.6, 142.7 (2C gal), 149.1, 149.2 (4C gal), 165.1, 165.9 (2C=O); ESI-MS 1169.5 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.

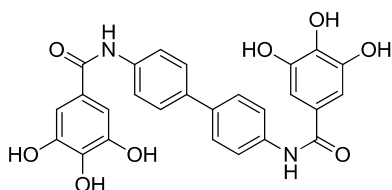


64

5.1.3.3. Síntesis de las diamidas finales **65** y **66**.

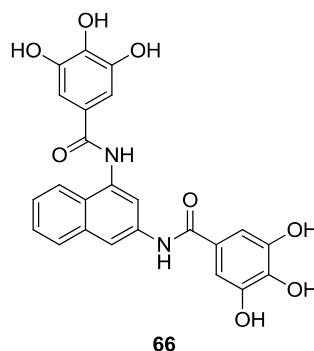
Se prepararon siguiendo el procedimiento de desprotección de grupos TBS descrito en el apartado 5.1.2.11.

4,4'-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)amino]-1,1'-bifenilo (65). Se obtuvo a partir de 298 mg de **63**. Rto: 77%; p.f. 248 °C (descompone); IR ν 3330 (NH), 3138 (OH), 1605 (C=O), 1513 (Ar), 1043 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 6.98 (s, 4H, gal), 7.62 (d, J = 8.7, 4H, bifenilo), 7.84 (d, J = 8.7, 4H, bifenilo), 8.78 (s a, 2H, 2OH), 9.13 (s a, 4H, 4OH), 9.96 (s, 2H, 2NH); ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 107.2 (4CH gal), 120.4 (4CH bifenilo), 125.0 (2C gal), 126.2 (4CH bifenilo), 134.4, 136.8, 138.7 (4C bifenilo, 2C gal), 145.5 (4C gal), 165.5 (2C=O); ESI-MS 487.1 (M – H) $^-$.



65

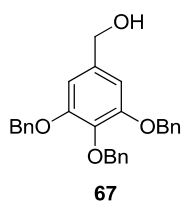
1,3-Bis[(3,4,5-trihidroxibenzoil)amino]naftaleno (66). Se obtuvo a partir de 154 mg de **64**. Rto 87%; p.f. 250 °C (descompone); IR ν 3297 (OH, NH), 1600 (C=O), 1529, 1498, 1430 (Ar); ^1H -RMN (300 MHz, CD $_3$ OD) δ 7.02 (s, 2H, gal), 7.12 (s, 2H, gal), 7.42-7.53 (m, 2H, naft), 7.84-7.87 (m, 2H, naft), 7.92 (d, J = 8.0, 1H, naft), 7.25 (d, J = 1.8, 1H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CD $_3$ OD) δ 108.2 (2CH gal), 108.4 (2CH gal), 117.7, 120.3, 123.8 (3CH naft), 126.2 (C gal), 126.3 (CH naft), 126.5 (C gal), 127.7 (CH naft), 128.3 (C naft), 129.1 (CH naft), 135.3, 136.0, 137.4 (3C naft), 138.5, 138.7 (2C gal), 146.8, 146.8 (4C gal), 169.3, 170.2 (2C=O); ESI-MS 461.1 (M – H) $^-$.



5.1.4. Síntesis del compuesto final **73**.

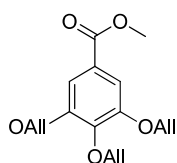
5.1.4.1. Síntesis de los alcoholes bencílicos de partida **67** y **71**.

[3,4,5-Tris(benciloxi)fenil]metanol (67). Sobre una disolución de 4.68 g (10 mmol, 1 equivalente) del éster metílico **6** en 50 mL de THF anhidro se añade una suspensión de 470 mg (12 mmol, 1.2 equivalentes) de LiAlH_4 en 30 mL de THF anhidro y la mezcla se agita bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente durante 1 h. Transcurrido este tiempo, la reacción se calienta a reflujo durante 2 h y se enfría en un baño de agua-hielo. A continuación se añade, por este orden, 0.3 mL de agua, 0.5 mL de NaOH al 15% y 1.4 mL de agua. El sólido resultante se filtra, se resuspende en 200 mL de éter etílico y se calienta a reflujo durante 30 min. La mezcla se filtra y los dos filtrados obtenidos se juntan y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose 3.69 g (Rto: 84%) de **67** el cual se usa directamente sin necesidad de mayor purificación. p.f. 105-107 °C (metanol) (lit.⁷² p.f. 111 °C); IR ν 3436 (OH), 1646, 1597, 1507 (Ar), 1122 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 1.72 (t, J = 5.9, 1H, OH), 4.52 (d, J = 5.8, 2H, CH_2OH), 5.01 (s, 2H, CH_2Ph), 5.06 (s, 4H, 2 CH_2Ph), 6.63 (s, 2H, gal), 7.22-7.36 (m, 15H, Ph); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 65.7 (CH_2OH), 71.5 (2 CH_2Ph), 75.5 (CH_2Ph), 106.6 (2CH gal), 127.7, 128.1, 128.2, 128.5, 128.8, 128.9 (15CH Ph), 137.0, 137.4, 138.0, 138.1 (3C Bn, 2C gal), 153.3 (2C gal); ESI-MS 427.2 ($\text{M} + \text{H}$)⁺.



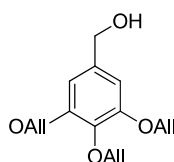
3,4,5-Tris(aliloxi)benzoato de metilo (70). Una disolución de 1.00 g (5.43 mmol, 1 equivalente) de galato de metilo y 6.84 g (49.5 mmol, 9 equivalentes) de K_2CO_3

anhidro en 70 mL de DMF se calienta a 65 °C bajo atmósfera de argón. Una vez que la mezcla de reacción ha alcanzado dicha temperatura, se adiciona 2.63 g de bromuro de alilo (21.7 mmol, 4 equivalentes) y se mantiene la agitación a 65 °C durante 3 h. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se vierte en 300 mL de una mezcla de hielo y agua, se extrae con éter etílico, se lava con agua y disolución saturada de NaCl, se filtra, seca y se evapora el disolvente a presión reducida dando lugar a un aceite que se purifica por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 9:1) obteniéndose 1.50 g (Rto: 90%) de **70** en forma de aceite incoloro.⁷⁴ IR ν 1721 (C=O), 1650 (C=C), 1588 (Ar); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 3.87 (s, 3H, Me), 4.62 (d, J = 6.0, 6H, 3OCH₂), 5.39 (m, 6H, 3CH₂=), 6.06 (m, 3H, 3CH=), 7.27 (s, 2H, gal); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 52.0 (CH₃), 69.6, 73.8, (3CH₂), 108.5 (2CH gal), 117.4, 117.5 (3CH₂=), 124.9 (C gal), 132.9, 134.1 (3CH=), 141.7, 152.1 (3C gal), 166.3 (C=O); ESI-MS 327.1 (M + Na)⁺.



70

[3,4,5-Tris(aliloxi)fenil]metanol (71).⁷⁴ Sobre una suspensión de 374 mg (9.86 mmol, 2 equivalentes) de LiAlH₄ en 6 mL THF se añade gota a gota una disolución de 1.50 g (4.93 mmol, 1 equivalente) de éster metílico **70** en 6 mL de THF. La reacción se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 3 h. Pasado este tiempo, la reacción se para mediante la adición de 0.30 mL agua, 0.30 mL de una disolución de NaOH al 15% en agua y 0.90 mL de agua originándose un precipitado que se elimina mediante filtración. La mezcla de reacción extrae con éter etílico, y los extractos orgánicos se juntan, se secan sobre Na₂SO₄ y se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose 1.35 g (Rto: cuantitativa) de **71** en forma de aceite amarillo pálido, el cual se puede usar en la siguiente reacción sin necesidad de purificación. IR ν 3392, 2871, 1649, 1594, 1505; ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 2.90 (s, 1H, OH), 4.40 (s, 2H, CH₂OH), 4.49 (d, J = 6.0, 6H, 3OCH₂), 5.11 (m, 6H, 3CH₂=), 5.97 (m, 3H, 3CH=), 6.50 (s, 2H, gal); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 65.0, 69.8, 74.1 (3CH₂O), 105.9 (2CH gal), 117.2, 117.5 (2CH₂=), 133.4, 134.6, 136.8 (2C gal), 152.5 (2C gal); ESI-MS 275.1 (M – H)[–].

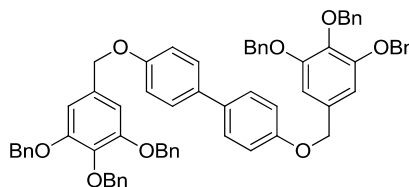


71

5.1.4.2. Síntesis de los éteres bencílicos protegidos **68**, **69** y **72**.

Procedimiento general. Una disolución de 4 equivalentes del alcohol bencílico correspondiente (**67** ó **71**), 4 equivalentes de trietilfosfina y 4 equivalentes de ADDP en THF (2.5 mL/mmol de alcohol bencílico) se agitan a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 10 min. Pasado este tiempo se añade el diol correspondiente (1 equivalente) disuelto en THF (1.7 mL/mmol) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche. El crudo de reacción se filtra y el disolvente se evapora a presión reducida. El residuo obtenido se redissuelve en DCM, se lava con agua y con una disolución saturada de NaCl, la fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna utilizando el eluyente adecuado, obteniéndose el éter correspondiente.

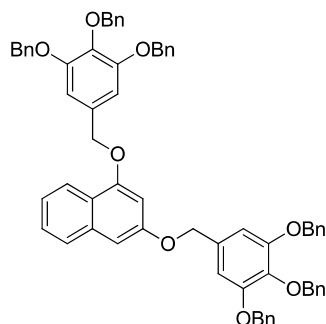
4,4'-Bis{[3,4,5-tris(benciloxi)bencil]oxi}-1,1'-bifenilo (68**).** Se obtuvo a partir de 40 mg de 4,4'-dihidroxibifenilo. Cromatografía: hexano:DCM 2:8 → DCM. Rto: 55%; p.f. 150-152 °C; IR ν 1596 (Ar), 1135 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 4.99 (s, 4H, 2CH₂), 5.08 (s, 4H, 2CH₂), 5.13 (s, 8H, 4CH₂), 6.80 (s, 4H, gal), 6.98-7.03 (m, 4H, bifenilo), 7.26-7.50 (m, 34H, bifenilo, Bn); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 70.6 (2CH₂), 71.6 (4CH₂ meta), 75.6 (2CH₂ para), 107.6 (4CH gal), 115.6 (4CH bifenilo), 127.8, 128.1, 128.2, 128.5, 128.8, 128.9 (4CH bifenilo, 30CH Bn), 132.9, 134.1 (2C bifenilo, 2C gal), 137.4 (4C Bn), 138.2, 138.6 (2C Bn, 2C gal), 153.4 (4C gal), 158.2 (2C bifenilo).



68

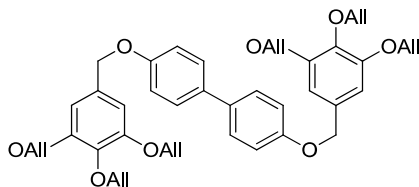
1,3-Bis{[3,4,5-tris(benciloxi)bencil]oxi}naftaleno (69**).** Se obtuvo a partir de 34 mg de 1,3-dihidroxinaftaleno. Cromatografía: hexano:DCM 2:8 → DCM. Rto: 25%; p.f. 148-150 °C; IR ν 1596 (Ar), 1135 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 5.04 (s,

2H, CH₂), 5.07 (s, 2H, CH₂), 5.08 (s, 2H, CH₂), 5.09 (s, 2H, CH₂), 5.14 (s, 8H, 4CH₂), 6.61 (d, *J* = 2.0, 1H, naft), 6.80 (s a, 3H, gal, naft), 6.81 (s, 2H, gal), 7.27-7.48 (m, 32H, Bn, gal), 7.67 (d, *J* = 8.0, 1H, naft), 8.13 (d, *J* = 8.1, 1H, naft); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 70.7 (2CH₂), 71.7 (4CH₂ *meta*), 75.7 (2CH₂ *para*), 99.7, 100.0 (2CH naft), 107.5, 107.9 (4CH gal), 122.4 (C naft), 122.6, 123.7, 127.1, 127.7 (4CH naft), 127.9, 128.3, 128.4, 128.7, 129.0, 129.1 (30CH Bn), 132.8 (2C gal), 135.6 (C naft), 137.5 (4C Bn), 138.3, 138.6, 138.7 (2C Bn, 2C gal), 153.5 (4C gal), 156.0, 157.5 (2C naft).



69

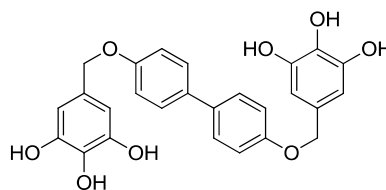
4,4'-Bis{[3,4,5-tris(aliloxi)bencil]oxi}-1,1'-bifenilo (72). Se obtuvo a partir de 40 mg de 4,4'-dihidroxibifenilo. Cromatografía: hexano:DCM 4:6 -> DCM. Rto: 57%; p.f. 91-92 °C; IR ν 1628 (Ar), 1592 (C=C), 1107 (C-O); ¹H-RMN (300, MHz, CDCl₃) δ 4.61 (d, *J* = 5.1, 12H, 6-CH₂-CH=), 4.99 (s, 4H, 2OCH₂), 5.21-5.48 (m, 12H, 6CH₂=), 6.02-6.22 (m, 6H, 6-CH=), 6.70 (s, 4H, gal), 7.05 (d, *J* = 8.6, 4H, bifenilo), 7.51 (d, *J* = 8.6, 4H, bifenilo); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 70.3 (4OCH₂ All), 70.6 (2OCH₂), 74.5 (2OCH₂ All), 107.2 (4CH gal), 115.6 (4CH bifenilo), 117.8, 117.9 (6CH₂= All), 128.1 (4CH bifenilo), 132.8 (2C gal), 133.8 (4CH= All), 134.1 (2C bifenilo), 135.1 (2CH= All), 137.9 (2C gal), 153.2 (4C gal), 158.3 (2C bifenilo); ESI-MS 725.3 (M + Na)⁺.



72

5.1.4.3. Síntesis del éter final **4,4'-bis[(3,4,5-trihidroxibencil)oxi]-1,1'-bifenilo (73)**.

Se disuelven 100 mg (0.14 mmol, 1 equivalente) del derivado **72**, 267 mg (1.71 mmol, 12 equivalentes) de DMBA y 49 mg (0.042 mmol, 0.30 equivalentes) de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ en 1 mL de una mezcla 1:1 de DCM:metanol. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h. Pasado este tiempo se evapora el disolvente y se añaden 10 mL de DCM apareciendo **72** en forma de precipitado blanco que se aísla por filtración. Rto: cuantitativo; p.f. 191-193°C; IR ν 3364 (OH) 1692, 1613 (Ar), 1592 (C=C), 1107 (C-O); ^1H -RMN (300, MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 4.87 (s, 4H, 2OCH_2), 6.35 (s, 4H, gal), 7.00 (d, $J = 8.4$, 4H, bifenilo), 7.50 (d, $J = 8.4$, 4H, bifenilo), 8.11 (s a, 2H, OH), 8.87 (s a, 4H, OH); ^{13}C -RMN (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 69.4 (2OCH_2), 106.5 (4CH gal), 115.1 (4CH bifenilo), 127.0 (2C gal), 127.1 (4CH bifenilo), 132.2, 132.5 (2C gal, 2C bifenilo), 145.9 (2C gal), 157.5 (2C bifenilo); ESI-MS 461.4 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.



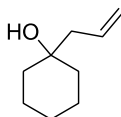
73

5.1.5. Síntesis de los compuestos finales **83** y **84**.

5.1.5.1. Síntesis de **1-allylcyclohexanol (74)**.⁷⁶

Una suspensión de 1.22 g (50 mmol) de magnesio metálico, 4.1 mL (47 mmol) de bromuro de alilo y cantidades catalíticas de yodo y dicloroetano se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón hasta la completa desaparición del color violeta. A continuación, se añade una disolución de 2.00 g (20 mmol) de ciclohexanona en 60 mL de éter etílico anhidro con agitación. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 h tras las cuales se calienta a reflujo durante 30 min. Tras enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se hidroliza adicionando lentamente una disolución saturada de NH_4Cl (aproximadamente 100 mL). El crudo se extrae con éter etílico, se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna (hexano:DCM 40:60 a DCM), obteniéndose 2.55 g (Rto: 88%) de **74** (aceite). IR ν 3383 (OH), 1639 (C=C); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 1.17-1.25 (m, 1H, ciclohexano), 1.31-1.59 (m, 9H, ciclohexano), 1.76 (s, 1H, OH), 2.14 (d, $J = 7.5$, 2H, CH_2CH), 4.99-5.07 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.82 (ddt, $J = 17.2$, 10.1, 7.4, 1H,

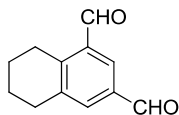
$\text{CH}=\text{CH}_2$); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 22.1 (2CH_2), 25.7 (CH_2), 37.3 (2CH_2), 46.7 (CH_2CH), 70.9 (C), 118.4 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 133.8 ($\text{CH}=\text{CH}_2$); ESI-MS 163.1 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.



74

5.1.5.2. Síntesis de **5,6,7,8-tetrahidronaftaleno-1,3-dicarbaldehído (75)**.

A una disolución de 2.55 g (18 mmol, 1 equivalente) de **74** en 20 mL de DMF enfriada a 0 °C se añade gota a gota una disolución de 5 mL de POCl_3 (57 mmol, 3.2 equivalentes) en 4 mL de DMF (57 mmol, 3.2 equivalentes). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min y a reflujo durante 5-6 h. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se añade una mezcla de hielo (163 g), acetato sódico (8.10 g) y agua (50 mL) y la reacción se agita durante toda la noche a temperatura ambiente. El crudo de reacción se extrae con acetato de etilo, se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna (hexano:acetato de etilo 99:1 a 90:1), obteniéndose 155 mg (Rto: 15%) de **75**. p.f. 44-46 °C (lit.⁷⁵ p.f. 45 °C); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 1.81-1.88 (m, 4H, 2CH_2), 2.92 (t, $J = 5.9$, 2H, CH_2), 3.27 (t, $J = 5.9$, 2H, CH_2), 7.81 (s, 1H, Ar), 8.11 (d, $J = 1.2$, 1H, Ar), 10.01 (s, 1H, CHO), 10.32 (s, 1H, CHO); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 22.0, 22.4 (2CH_2), 27.1, 30.0 ($2\text{CH}_2\text{C}$), 131.7 (CH), 134.0, 134.6 (2C), 134.9 (CH), 140.1, 146.6 (2C), 191.4, 192.2 (2CHO); ESI-MS 203.1 ($\text{M} + \text{CH}_3$) $^+$.

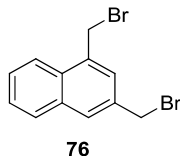


75

5.1.2.3. Síntesis de **1,3-bis(bromometil)naftaleno (76)**.

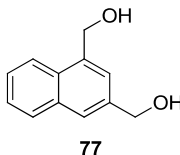
Una disolución de 1.00 g (6.4 mmol, 1 equivalente) de 1,3-dimetilnaftaleno y 2.28 g (13 mmol, 2 equivalentes) de NBS en 10 mL de CHCl_3 anhidro se calienta a reflujo bajo atmósfera de argón. Una vez alcanzada la temperatura de reflujo se añaden 10 mg de AIBN y se mantiene a reflujo durante 15 h. Una vez enfriada hasta temperatura ambiente, la mezcla se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna (hexano a

hexano:DCM 9:1), obteniéndose 0.91 g (Rto: 45%) de **76**. p.f. 113-115 °C (lit.⁷⁷ p.f. 118 °C); IR ν 1508 (Ar), 783, 754 (C-Br); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 4.63 (s, 2H, CH₂), 4.94 (s, 2H, CH₂), 7.55 (t, J = 7.1, 1H, Ar), 7.58 (s, 1H, Ar), 7.63 (t, J = 7.3, 1H, Ar), 7.83 (s, 1H, Ar), 7.86 (d, J = 8.1, 1H, Ar), 8.14 (d, J = 8.3, 1H, Ar); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 31.4, 33.7 (2CH₂), 124.0, 127.2, 127.6, 128.8, 129.3, 129.8 (6CH), 131.0, 134.2, 134.6, 135.0 (4C); ESI-MS 331.9 (M + H₂O)⁺.



5.1.5.4. Síntesis de 1,3-bis(hidroximetil)naftaleno (**77**).

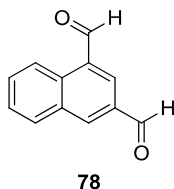
Se disuelven 0.84 g (2.7 mmol, 1 equivalente) de **76** en una disolución de 8.23 g (82 mmol, 30.4 equivalentes) de CaCO₃ en 8 mL de 1,4-dioxano y 17 mL de agua. La mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 24 h. Pasado este tiempo, la reacción se enfría hasta temperatura ambiente y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se redissuelve en acetato de etilo y se lava con agua. La fase acuosa se extrae con acetato de etilo y las fases orgánicas se juntan, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose 0.50 g (Rto: cuantitativo) de **77** (aceite). IR ν 3307 (OH), 1682 (Ar); ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 3.67 (s a, 2H, 2OH), 4.51 (s, 2H, CH₂), 4.81 (s, 2H, CH₂), 7.28 (s, 1H, Ar), 7.34-7.39 (m, 2H, Ar), 7.46 (s, 1H, Ar), 7.64-7.67 (m, 1H, Ar), 7.77-7.79 (m, 1H, Ar); ¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ 64.2, 66.1 (2CH₂), 125.4, 126.4, 127.2, 127.7, 130.4 (6CH), 132.9, 136.1, 139.1, 140.5 (4C); ESI-MS 171.1 (M – OH)⁺.



5.1.5.5. Síntesis de naftaleno-1,3-dicarbaldehído (**78**).

A una disolución de 1.07 g (4.9 mmol) de PCC en 12 mL de DCM anhidro se añade una disolución de 0.50 g (2.7 mmol) de **77** en 25 mL de DCM anhidro. Después de 2 h de agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón, se añaden 50 mL de éter etílico, se filtra sobre celita y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna (hexano:DCM 2:8 a DCM), obteniéndose 224 mg (Rto: 46%) de **78**. p.f. 128-129 °C

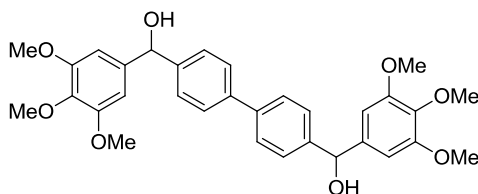
(lit.⁷⁷ p.f. 124 °C). IR ν 1684 (CHO); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.71 (ddd, J = 8.2, 7.0, 1.2, 1H, Ar), 7.85 (ddd, J = 8.5, 7.0, 1.5, 1H, Ar), 8.10 (d, J = 8.2, 1H, Ar), 8.46 (d, J = 1.7, 1H, Ar), 8.58 (s, 1H, Ar), 9.31 (dd, J = 8.6, 0.8, 1H, Ar), 10.23 (s, 1H, CHO), 10.44 (s, 1H, CHO); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 125.9, 128.5, 130.5, 132.5 (4CH), 132.7, 133.3, 133.5, 133.7 (4C), 133.8, 140.2 (2CH), 191.1, 193.3 (2CHO); ESI-MS 199.1 (M + CH₃)⁺.



5.1.5.6. Síntesis de los alcoholes intermedios **79** y **80**.

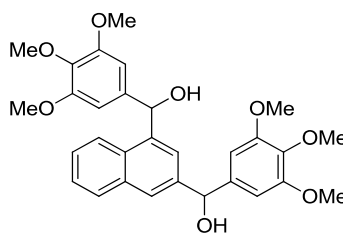
Procedimiento general. Sobre una suspensión de 97 mg (4.0 mmol, 4 equivalentes) de magnesio, cantidades catalíticas de yodo y de dibromoetano y 7 mL de THF anhidro se añade una disolución de 0.99 g (4.0 mmol, 4 equivalentes) de 5-bromo-1,2,3-trimetoxibenceno en 3 mL de THF anhidro y la mezcla se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Una vez ha desaparecido el color característico del yodo, se añade gota a gota una disolución del dicarbaldehído correspondiente (1.0 mmol, 1 equivalente) en 20 mL de THF anhidro y la reacción se agita durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfría en baño de hielo y se añade lentamente una disolución saturada de NH₄Cl. Completada la hidrólisis, la reacción se extrae con DCM, las fases orgánicas se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna utilizando el eluyente adecuado.

4,4'-Bis[hidroxi(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,1'-bifenilo (79). Se obtuvo a partir de 200 mg de 1,1'-bifenil-4,4'-dicarbaldehído. Cromatografía: hexano:acetato de etilo 7:3 a acetato de etilo. Rto: 25%; p.f. 179-181 °C; IR ν 3443 (OH), 1658 (Ar), 1126 (C-O); ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 3.83 (s, 18H, 6CH₃), 5.80 (s, 2H, 2CHOH), 6.63 (s, 4H, gal), 7.42-7.45 (m, 4H, bifenilo), 7.54-7.57 (m, 4H, bifenilo); ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 56.5 (4CH₃ *meta*), 61.1 (2CH₃ *para*), 76.4 (2CHOH), 104.0 (4CH gal), 127.3, 127.5 (8CH bifenilo), 137.8, 139.7, 140.4, 143.1 (4C bifenilo, 4C gal), 153.7 (4C gal); ESI-MS 529.3 (M – OH)⁻.



79

1,3-Bis[hidroxi(3,4,5-trimetoxifenil)metil]naftaleno (80). Se obtuvo a partir de 200 mg de **78**. Cromatografía: DCM:acetato de etilo 9:1 → acetato de etilo. Rto: 25%; p.f. 76-77 °C; ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 3.70 (s, 3H, CH_3), 3.72 (s, 3H, CH_3), 3.80 (s, 6H, 2 CH_3), 3.81 (s, 3H, CH_3), 3.82 (s, 3H, CH_3), 5.29 (s a, 1H, CHOH), 6.43 (s a, 1H, CHOH), 6.56 (d, $J = 3.0$, 2H, gal), 6.64 (d, $J = 1.7$, 2H, gal), 7.45-7.48 (m, 2H, naft), 7.61 (dd, $J = 4.3$, 1.4, 1H, naft), 7.87-7.90 (m, 2H, naft), 8.02-8.05 (m, 1H, naft); ^{13}C -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 56.2, 56.3 (4 CH_3O meta), 61.0 (2 CH_3O para), 73.6, 76.5 (2 CHOH), 103.7, 104.5 (4CH gal), 123.4, 124.1, 125.5, 126.2, 126.5, 129.2 (6CH naft), 130.4, 134.0 (2C naft), 137.3, 137.5 (2C gal), 138.9 (C naft), 139.6, 139.8 (2C gal), 140.8 (C naft), 153.3 (2C gal), 153.4 (2C gal).



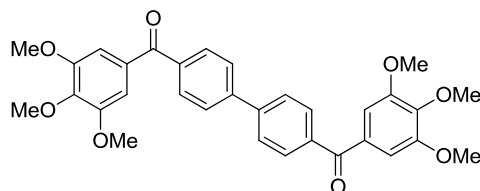
80

5.1.5.7. Síntesis de las cetonas intermedias **81** y **82**.

Procedimiento general. Sobre una disolución de 1 equivalente de **79** u **80** enfriada a 0 °C en DCM anhidro (20 mL/mmol de diol) se añaden tamices moleculares previamente activados y 3 equivalentes de PDC. La reacción se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 24 h. El crudo de reacción se filtra sobre celita, el disolvente se evapora a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna utilizando el eluyente adecuado.

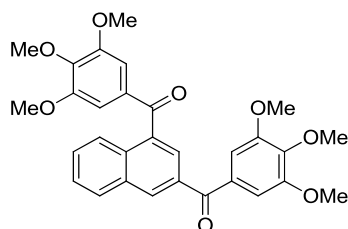
4,4'-Bis(3,4,5-trimetoxibenzoil)-1,1'-bifenilo (81). Se obtuvo a partir de 126 mg de **79**. Cromatografía: DCM:acetato de etilo 98:2 a acetato de etilo. Rto: 57%; p.f.

224-226 °C; IR ν 1652 (C=O), 1581 (Ar), 1127 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 3.89 (s, 12H, 4CH₃ *meta*), 3.95 (s, 6H, 2CH₃ *para*), 7.10 (s, 4H, gal), 7.77-7.79 (m, 4H, bifenilo), 7.91-7.94 (m, 4H, bifenilo); ^{13}C -RMN (75MHz, CDCl_3) δ 56.6 (4CH₃ *meta*), 61.3 (2CH₃ *para*), 108.0 (4CH gal), 127.4, 131.0 (8CH bifenilo), 132.8 (2C gal), 137.6, 142.4, 144.0 (4C bifenilo, 2C gal), 153.2 (4C gal), 195.5 (2C=O); ESI-MS 543.3 (M + H)⁺.



81

1,3-Bis(3,4,5-trimethoxybenzoyl)naftaleno (82). Se obtuvo a partir de 120 mg de **80**. Cromatografía: DCM a DCM:acetato de etilo 8:2. Rto: 40%; p.f. 69-71 °C; ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 3.81 (s, 6H, 2CH₃ *meta*), 3.86 (s, 6H, 2CH₃ *meta*), 3.95 (s, 3H, CH₃ *para*), 3.96 (s, 3H, CH₃ *para*), 7.11 (s, 2H, gal), 7.16 (s, 2H, gal), 7.62-7.65 (m, 2H, naft), 8.00-8.03 (m, 2H, naft), 8.07-8.10 (m, 1H, naft), 8.40 (s, 1H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 56.5 (4CH₃ *meta*), 61.1 (2CH₃ *para*), 107.9, 108.2 (4CH gal), 125.9, 126.8, 127.6, 129.6, 129.9 (5CH naft), 132.3, 132.6, 132.7, 132.8 (2C gal, 2C naft), 133.8 (CH naft, C naft), 137.2 (C naft), 142.5, 143.4 (2C gal), 153.1, 153.2 (4C gal), 195.0, 196.2 (2C=O); ESI-MS 517.3 (M + H)⁺, 539.2 (M + Na)⁺.



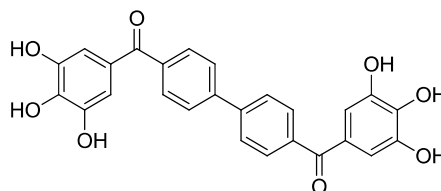
82

5.1.5.8. Síntesis de las cetonas finales **83** y **84**.

Procedimiento general. Sobre una disolución de 1 equivalente de **81** u **82** enfriada a 0 °C en DCM anhidro (30 mL/mmol de dicetona) se añaden 0.3 mL (18 equivalentes) de BBr_3 bajo atmósfera de argón. La mezcla se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Después se añade gota a gota metanol y se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo de la reacción se redissuelve en éter etílico,

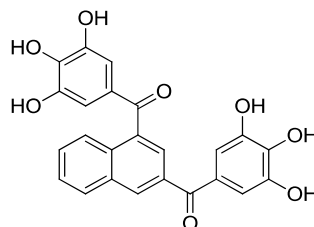
se lava con agua, se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por recristalización de DCM/metanol.

4,4'-Bis(3,4,5-trihidroxibenzoil)-1,1'-bifenilo (83). Se obtuvo a partir de 94 mg de **81**. Rto: 68%; p.f. 278 °C (descompone); IR ν 3244 (OH), 1592 (C=O), 1049 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 6.99 (s, 4H, gal), 7.85-7.88 (m, 4H, bifenilo), 7.92-7.95 (m, 4H, bifenilo), 8.34 (s a, 6H, OH); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 112.2 (4CH gal), 128.8 (4CH bifenilo), 130.0 (2C gal), 132.3 (4CH bifenilo), 140.1, 141.1 (2C bifenilo, 2C gal), 145.4 (2C bifenilo), 147.4 (4C gal), 198.5 (2C=O); ESI-MS 457.1 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.



83

1,3-Bis(3,4,5-trihidroxibenzoil)naftaleno (84). Se obtuvo a partir de 88 mg de **82**. Rto: 45%; p.f. 273 °C (descompone); IR ν 3250 (OH), 1650, 1595 (C=O), 1033 (C-O); ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 6.99 (s, 2H, gal), 7.04 (s, 2H, gal), 7.65-7.69 (m, 2H, naft), 7.86 (d, $J = 1.6$, 1H, naft), 7.95-7.98 (m, 1H, naft), 8.19-8.22 (m, 1H, naft), 8.36 (s a, 6H, OH), 8.43 (s a, 1H, naft); ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 110.9, 111.0 (4CH gal), 126.4, 126.5, 128.1 (3CH naft), 129.1 (C gal), 129.7 (CH naft), 129.8 (C gal), 130.7, 132.9 (2CH naft), 133.0, 133.5, 135.5 (3C naft), 138.7, 139.1, 140.0 (2C gal, C naft), 146.1, 146.2 (4C gal), 194.7, 196.0 (2C=O); ESI-MS 431.1 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.



84

5.2. Bioquímica.

Reactivos generales y anticuerpos. Los reactivos fueron adquiridos en Sigma (MTT, EDTA, ditioneitol, acetil-CoA, malonil-CoA, y NADPH) o en Alexis Biochemicals (C75). Los anticuerpos primarios provienen de Santa Cruz Biotechnology [monoclonal de ratón anti- β -actina (C-4), monoclonal de ratón anti-FASN, policlonal de ratón anti- β -actina y policlonal de conejo anti-Her-2 (Neu-C18)], de Thermo Fisher [monoclonal de ratón anti-p-Her-2 (c-erb-2 Ab18)], o de Cell Signaling Technology [policlonales de conejo anti-PARP, anti-AKT, anti-p-AKTSer473, anti-ERK-1 y -2 y monoclonales de ratón anti-p-ERK-1 y -2]. Los anticuerpos conjugados con peroxidasa secundarios se adquirieron en Calbiochem.

Líneas celulares y cultivo celular. Las células se incubaron a 37 °C en presencia de un 5% de CO₂. Las líneas celulares tumorales MCF-7 y MDA-MB-231 se compraron a American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) y fueron mantenidas en medio Dulbecco's Modified Eagle's (Gibco) que contiene un 10% de suero bovino fetal desactivado por calor (FBS, HyClone Laboratories), 1% de L-glutamina, 1% de piruvato sódico, 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptamicina (Gibco). La línea de cancer de mama SK-Br3 proviene del Eucellbank (Barcelona) y fue mantenida en un medio McCoy's 5A con un 10% de FBS, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de sodio, 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptamicina.

5.2.1. Ensayo de citotoxicidad.

La sensibilidad de las células a los compuestos sintetizados se determinó mediante un ensayo estándar basado en el uso de MTT. Brevemente, el día anterior al experimento, las células se siembran en placas de 96 pocillos con una densidad de $5 \text{ ó } 7 \cdot 10^3/100 \text{ µL/pocillo}$. El día del experimento se retira el medio y las células se incuban durante 48 h en un medio fresco el cual contiene diferentes concentraciones de los compuestos a ensayar. Pasado este tiempo se retira el medio, se añade medio fresco (100 µL/pocillo) y 10 µL/pocillo de una disolución de 5 mg/mL de MTT y se incuba durante 3 h a 37 °C. Después de retirar el sobrenadante, los cristales de formazán que han formado las células metabólicamente viables se disuelven en DMSO (100 µL/pocillo) y se cuantifica la absorbancia a 570 nm en un lector de placas multipocillo (Modelo Anthos Labtec 2010 1.7).

5.2.2. Ensayo de actividad enzimática de FASN.

Tras incubación durante 24 h con el compuesto objeto de estudio, las células se recogen por tratamiento con una disolución de tripsina-EDTA, se aíslan por centrifugación, se lavan dos veces con tampón fosfato frío (*phosphate buffered solution*, PBS) y se resuspenden en PBS. Las células se sonicán durante 30 min a 4 °C (PSelecta Ultrasons) y se centrifugan durante 15 min a 4 °C para obtener los sobrenadantes libres de partículas. La actividad de FASN, expresada en nmol NADPH oxidado·min⁻¹·mg⁻¹ de proteína, se determinó siguiendo un procedimiento previamente descrito en muestras con igual cantidad de proteína total (medida mediante un ensayo Lowry) mediante la determinación espectrofotométrica de NADPH oxidado a 340 nm.

5.2.3. Silenciado del gen de FASN por medio de un ARN pequeño interferente (*small-interfering RNA*, siRNA).

Para bloquear la expresión de FASN en células SK-Br3 se utilizó una mezcla de tres siRNA específicos para la diana formados por 19-25 nucleótidos de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology, siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. Una vez realizada la transfección se determinó la citotoxicidad de los compuestos **52**, **53** y **61** siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 5.2.1 a excepción de que el tiempo de incubación con los compuestos fue de 24 h.

5.2.4. Análisis de los niveles de expresión de p185HER2/neu, fosfo-p185HER2/neu, ERK1/2, fosfo-ERK1/2, AKT, fosfo-AKTSer473, PARP y FASN.

Las células SK-Br3 se incubaron durante los diferentes tiempos en presencia de los compuestos **52**, **53** y **61**. Terminado el tratamiento las células se recogen por tratamiento con una disolución de tripsina-EDTA, se lavan con PBS frío y se almacenan a -80°C. Para la lisis, las células se resuspenden en una disolución tampón (1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 100 µg/mL fluoruro de fenilmetilsulfonilo 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) y se mantienen a 4 °C mientras son sometidas a agitación orbital cada 2 min durante 30 min. Muestras con igual cantidad de proteína total (medida mediante un ensayo Lowry) se calientan en disolución tampón de Laemmli y dodecilsulfato sódico (SDS) durante 5 min a 95 °C y se separan en un gel de un 3–8% SDS-poliacrilamida (p185HER2/neu, fosfo-p185HER2/neu) o de un 4–12% SDS-poliacrilamida (AKT, fosfo-AKT, ERK1/2, fosfo-ERK1/2, PARP y FASN). Una vez realizada la electroforesis las proteínas separadas se transfieren a membranas de nitrocelulosa. Dichas membranas se incuban 1 h a temperatura

ambiente en disolución tampón de bloqueo (2.5% polvo de leche desnatada en una disolución tampón de 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl y 0.05% Tween-20; TBS-T) para evitar uniones no específicas de los anticuerpos. Posteriormente las membranas se incuban a 4 °C con el correspondiente anticuerpo primario diluido en el tampón de bloqueo durante toda la noche. Después de tres lavados de 5 min con TBS-T, las membranas se incuban durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa y se revelan siguiendo las instrucciones del *kit* comercial suministradas por el fabricante (*West Pico chemiluminescent substrate*, *BIO-RAD*).

5.2.5. Estabilidad en suero.

A 0.75 mL de suero humano (Sigma, S7023) o de ratón (Europa Bioproducts, EQSM-0100) previamente atemperado a 37 °C durante 10 min se añaden 0.25 mL de una disolución 2 mM del compuesto objeto de estudio en PBS (pH = 7.4) y la mezcla se incuba a 37 °C durante el tiempo de interés. Una vez transcurrido éste, 0.5 mL de la mezcla se añaden sobre 0.75 mL de acetonitrilo frío, se agita y se incuba durante 10 min en hielo para precipitar las proteínas. El sobrenadante se separa del precipitado por centrifugación a 39000g durante 10 min y 50 µL del mismo son analizados mediante HPLC-MS.

El análisis de HPLC-MS se ha llevado a cabo en un instrumento Agilent 1200LC-MSD VL empleando una columna Eclipse XDB-C18 (5 µm, 4.6 mm x 150 mm) precedida de una precolumna (5 µm, 4.6 mm x 12.5 mm). Como fase móvil se ha utilizado una mezcla de eluyentes A (95:5 agua:metanol) y B (95:5 metanol:agua) con 0.1% de hidróxido amónico y 0.1% de ácido fórmico. El gradiente aplicado ha consistido en 0% de B (2 min) el cual se ha incrementado hasta 60% de B durante 6 min y hasta 100% de B durante 12 min más seguido de un gradiente isocrático de 100% de B durante 5 min y equilibrado durante 5 min a 0% de B, todo ello a un flujo constante de 0.5 mL/min. El análisis de MS se ha realizado con una fuente de ionización por ESI con los siguientes parámetros: voltaje del capilar y del fragmentador: 3.0 kV y 72 V, respectivamente; temperatura del gas de secado y flujo del mismo: 350 °C y 10 L/min, respectivamente; presión del nebulizador: 20 psi. El análisis de HPLC-MS se realizó mediante detección del ión seleccionado (*selected ion monitoring*, SIM).

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. *Breast Cancer Facts & Figures 2009-2010*. American Cancer Society, Inc.: Atlanta, 2009.
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
3. Sul, H. S.; Smith, S. Fatty acid synthesis in eukaryotes. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Fifth Edition)*, Dennis, E. V.; Jean, E. V., Eds. Elsevier: San Diego, 2008; pp 155-190.
4. Chan, D. I.; Vogel, H. J. Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochem. J.* **2010**, *430*, 1-19.
5. White, S. W.; Zheng, J.; Zhang, Y. M.; Rock. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 791-831.
6. Leibundgut, M.; Maier, T.; Jenni, S.; Ban, N. The multienzyme architecture of eukaryotic fatty acid synthases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 714-725.
7. Jenni, S.; Leibundgut, M.; Maier, T.; Ban, N. Architecture of a fungal fatty acid synthase at 5 Å resolution. *Science* **2006**, *311*, 1263-1267.
8. Maier, T.; Jenni, S.; Ban, N. Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science* **2006**, *311*, 1258-1262.
9. Smith, S.; Witkowski, A.; Joshi, A. K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42*, 2289-2317.
10. Maier, T.; Leibundgut, M.; Boehringer, D.; Ban, N. Structure and function of eukaryotic fatty acid synthases. *Q. Rev. Biophys.* **2010**, *43*, 373-422.

11. Smith, S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* **1994**, *8*, 1248-1259.
12. Bokor, S.; Koletzko, B.; Decsi, T. Systematic review of fatty acid composition of human milk from mothers of preterm compared to full-term infants. *Ann. Nutr. Metab.* **2007**, *51*, 550-556.
13. Jakobsson, A.; Westerberg, R.; Jacobsson, A. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45*, 237-249.
14. Vander Heiden, M. G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 671-684.
15. Hirschhaeuser, F.; Sattler, U. G.; Mueller-Klieser, W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 6921-6925.
16. Ortega, A. D.; Sanchez-Arago, M.; Giner-Sanchez, D.; Sanchez-Cenizo, L.; Willers, I.; Cuezva, J. M. Glucose avidity of carcinomas. *Cancer Lett.* **2009**, *276*, 125-135.
17. Furuta, E.; Okuda, H.; Kobayashi, A.; Watabe, K. Metabolic genes in cancer: their roles in tumor progression and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1805*, 141-152.
18. Flavin, R.; Peluso, S.; Nguyen, P. L.; Loda, M. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol.* **2010**, *6*, 551-562.
19. Liu, H.; Liu, J. Y.; Wu, X.; Zhang, J. T. Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *1*, 69-89.
20. Milgram, L. Z.; Witters, L. A.; Pasternack, G. R.; Kuhajda, F. P. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 2115-2120.
21. Alo, P. L.; Visca, P.; Marci, A.; Mangoni, A.; Botti, C.; Di Tondo, U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer* **1996**, *77*, 474-482.
22. Nakamura, I.; Kimijima, I.; Zhang, G. J.; Onogi, H.; Endo, Y.; Suzuki, S.; Tuchiya, A.; Takenoshita, S.; Kusakabe, T.; Suzuki, T. Fatty acid synthase expression in japanese breast carcinoma patients. *Int. J. Mol. Med.* **1999**, *4*, 381-387.

23. Wang, Y.; Kuhajda, F. P.; Li, J. N.; Pizer, E. S.; Han, W. F.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W. Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell culture supernatants and in breast cancer patients. *Cancer Lett.* **2001**, *167*, 99-104.
24. Lu, S.; Archer, M. C. Fatty acid synthase is a potential molecular target for the chemoprevention of breast cancer. *Carcinogenesis* **2005**, *26*, 153-157.
25. Vazquez-Martin, A.; Ropero, S.; Brunet, J.; Colomer, R.; Menendez, J. A. Inhibition of Fatty Acid Synthase (FASN) synergistically enhances the efficacy of 5-fluorouracil in breast carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **2007**, *18*, 973-980.
26. Menendez, J. A.; Lupu, R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 763-777.
27. Kuhajda, F. P. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* **2000**, *16*, 202-208.
28. Abramson, H. N. The lipogenesis pathway as a cancer target. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5615-5638.
29. Pandey, P. R.; Liu, W.; Xing, F.; Fukuda, K.; Watabe, K. Anti-cancer drugs targeting fatty acid synthase (FAS). *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2012**, *7*, 185-197.
30. Omura, S. The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Bacteriol. Rev.* **1976**, *40*, 681-697.
31. Morisaki, N.; Funabashi, H.; Shimazawa, R.; Furukawa, J.; Kawaguchi, A.; Okuda, S.; Iwasaki, S. Effect of side-chain structure on inhibition of yeast fatty-acid synthase by cerulenin analogues. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *211*, 111-115.
32. Funabashi, H.; Kawaguchi, A.; Tomoda, H.; Omura, S.; Okuda, S.; Iwasaki, S. Binding site of cerulenin in fatty acid synthetase. *J. Biochem.* **1989**, *105*, 751-755.
33. Johansson, P.; Wiltschi, B.; Kumari, P.; Kessler, B.; Vonrhein, C.; Vonck, J.; Oesterhelt, D.; Grninger, M. Inhibition of the fungal fatty acid synthase type I multienzyme complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 12803-12808.
34. Chung, K. S.; Sun, N. K.; Lee, S. H.; Lee, H. J.; Choi, S. J.; Kim, S. K.; Song, J. H.; Jang, Y. J.; Song, K. B.; Yoo, H. S.; Simon, J.; Won, M. Cerulenin-mediated apoptosis is involved in adenine metabolic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *349*, 1025-1031.

35. Liu, X.; Shi, Y.; Giranda, V. L.; Luo, Y. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway sensitizes MDA-MB468 human breast cancer cells to cerulenin-induced apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 494-501.
36. Lupu, R.; Menendez, J. A. Pharmacological inhibitors of fatty acid synthase (FASN)--catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anti-cancer agents? *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2006**, *7*, 483-493.
37. Kuhajda, F. P.; Pizer, E. S.; Li, J. N.; Mani, N. S.; Frehywot, G. L.; Townsend, C. A. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 3450-3454.
38. Pappenberger, G.; Benz, J.; Gsell, B.; Hennig, M.; Ruf, A.; Stihle, M.; Thoma, R.; Rudolph, M. G. Structure of the human fatty acid synthase KS-MAT didomain as a framework for inhibitor design. *J. Mol. Biol.* **2010**, *397*, 508-519.
39. Zhou, W.; Simpson, P. J.; McFadden, J. M.; Townsend, C. A.; Medghalchi, S. M.; Vadlamudi, A.; Pinn, M. L.; Ronnett, G. V.; Kuhajda, F. P. Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7330-7337.
40. Rendina, A. R.; Cheng, D. Characterization of the inactivation of rat fatty acid synthase by C75: inhibition of partial reactions and protection by substrates. *Biochem. J.* **2005**, *388*, 895-903.
41. Menendez, J. A.; Vellon, L.; Mehmi, I.; Oza, B. P.; Ropero, S.; Colomer, R.; Lupu, R. Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 10715-10720.
42. Alli, P. M.; Pinn, M. L.; Jaffee, E. M.; McFadden, J. M.; Kuhajda, F. P. Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in neu-N transgenic mice. *Oncogene* **2005**, *24*, 39-46.
43. Cha, S. H.; Hu, Z.; Chohnan, S.; Lane, M. D. Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 14557-14562.
44. Wang, X.; Lin, J.; Chen, Y.; Zhong, W.; Zhao, G.; Liu, H.; Li, S.; Wang, L. Novel fatty acid synthase (FAS) inhibitors: design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1898-1904.

45. Pemble, C. W.; Johnson, L. C.; Kridel, S. J.; Lowther, W. T. Crystal structure of the thioesterase domain of human fatty acid synthase inhibited by Orlistat. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 704-709.
46. Yang, P. Y.; Liu, K.; Ngai, M. H.; Lear, M. J.; Wenk, M. R.; Yao, S. Q. Activity-based proteome profiling of potential cellular targets of Orlistat—an FDA-approved drug with anti-tumor activities. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 656-666.
47. Tian, W. X. Inhibition of fatty acid synthase by polyphenols. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 967-977.
48. Surh, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 768-780.
49. Cabrera, C.; Gimenez, R.; Lopez, M. C. Determination of tea components with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4427-4435.
50. Brusselmans, K.; Vrolix, R.; Verhoeven, G.; Swinnen, J. V. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5636-5645.
51. Wang, X.; Tian, W. Green tea epigallocatechin gallate: a natural inhibitor of fatty-acid synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *288*, 1200-1206.
52. Wang, X.; Song, K. S.; Guo, Q. X.; Tian, W. X. The galloyl moiety of green tea catechins is the critical structural feature to inhibit fatty-acid synthase. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 2039-2047.
53. Puig, T.; Relat, J.; Marrero, P. F.; Haro, D.; Brunet, J.; Colomer, R. Green tea catechin inhibits fatty acid synthase without stimulating carnitine palmitoyltransferase-1 or inducing weight loss in experimental animals. *Anticancer Res.* **2008**, *28*, 3671-3676.
54. Nakagawa, K.; Miyazawa, T. Chemiluminescence-high-performance liquid chromatographic determination of tea catechin, (-)-epigallocatechin 3-gallate, at picomole levels in rat and human plasma. *Anal. Biochem.* **1997**, *248*, 41-49.
55. Lau, D. S.; Archer, M. C. The 10t,12c isomer of conjugated linoleic acid inhibits fatty acid synthase expression and enzyme activity in human breast, colon, and prostate cancer cells. *Nutr. Cancer* **2010**, *62*, 116-121.
56. Menendez, J. A.; Colomer, R.; Lupu, R. Inhibition of fatty acid synthase-dependent neoplastic lipogenesis as the mechanism of gamma-linolenic acid-

- induced toxicity to tumor cells: an extension to Nwankwo's hypothesis. *Med. Hypotheses* **2005**, *64*, 337-341.
57. Richardson, R. D.; Smith, J. W. Novel antagonists of the thioesterase domain of human fatty acid synthase. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 2120-2126.
58. Rivkin, A.; Kim, Y. R.; Goulet, M. T.; Bays, N.; Hill, A. D.; Kariv, I.; Krauss, S.; Ginanni, N.; Strack, P. R.; Kohl, N. E.; Chung, C. C.; Varnerin, J. P.; Goudreau, P. N.; Chang, A.; Tota, M. R.; Munoz, B. 3-Aryl-4-hydroxyquinolin-2(1H)-one derivatives as type I fatty acid synthase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4620-4623.
59. Zeng, X. F.; Li, W. W.; Fan, H. J.; Wang, X. Y.; Ji, P.; Wang, Z. R.; Ma, S.; Li, L. L.; Ma, X. F.; Yang, S. Y. Discovery of novel fatty acid synthase (FAS) inhibitors based on the structure of ketoacetyl synthase (KS) domain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4742-4744.
60. Liu, B.; Wang, Y.; Fillgrove, K. L.; Anderson, V. E. Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, *49*, 187-193.
61. Nakazono, M.; Ma, L.; Zaitso, K. Synthesis of poly(3,4,5-trihydroxybenzoate ester) dendrimers and their chemiluminescence. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8185-8189.
62. Ley, S. V.; Baxendale, I. R.; Bream, R. N.; Jackson, P. S.; Leach, A. G.; Longbottom, D. A.; Nesi, M.; Scott, J. S.; Storer, R. I.; Taylor, S. J. Multi-step organic synthesis using solid-supported reagents and scavengers: a new paradigm in chemical library generation. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 3815-4195.
63. Solinas, A.; Taddei, M. Solid-supported reagents and catch-and-release techniques in organic synthesis. *Synthesis* **2007**, 2409-2453.
64. Huh, N.-W.; Porter, N. A.; McIntosh, T. J.; Simon, S. A. The interaction of polyphenols with bilayers: conditions for increasing bilayer adhesion. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 3261-3277.
65. Gooding, O. W.; Vo, L.; Bhattacharyya, S.; Labadie, J. W. Use of statistical design of experiments in the optimization of amide synthesis utilizing polystyrene-supported *N*-hydroxybenzotriazole resin. *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 576-583.
66. Kündig, E. P.; Enriquez-Garcia, A. Diastereoselective and enantioselective reduction of tetralin-1,4-dione. *Beilstein J. Org. Chem.* **2008**, *4*, No. 37.

67. Platt, K. L.; Oesch, F. Efficient synthesis of non-K-region trans-dihydrodiols of polycyclic aromatic hydrocarbons from o-quinones and catechols. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 265-268.
68. Jacobs, J.; Claessens, S.; Mbala, B. M.; Huygen, K.; De, K. N. New and highly efficient synthesis of 3-substituted 1-hydroxybenz[g]isoquinoline-5,10-diones. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1193-1199.
69. P. Ragot, J.; Steeneck, C.; Alcaraz, M.-L.; J. K. Taylor, R. The synthesis of 1,8-dihydroxynaphthalene-derived natural products: palmarumycin CP1, palmarumycin CP2, palmarumycin C11, CJ-12,371, deoxypreussomerin A and novel analogues. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 1073-1082.
70. Hawkins, M. J.; Greco, M. N.; Powell, E.; Garavilla, L. d.; Maryanoff, B. E. Preparation of phosphonic acid and phosphinic acid compounds as novel chymase inhibitors. US20100048513A1.
71. Rama Krishna, T.; Jayaraman, N. Dendritic encapsulation of amino acid-metal complexes. Synthesis and studies of dendron-functionalized L-tyrosine-metal (Zn^{II} , Co^{II}) complexes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 746-754.
72. Carlsson, A.; Lindqvist, M.; Fila-Hromadko, S.; Corrodi, H. Synthese von catechol-O-methyl-transferase-hemmenden verbindungen. in den catecholaminmetabolismus eingreifende substanzen. 1. Mitteilung. *Helv. Chim. Acta* **1962**, *45*, 270-276.
73. Tsukamoto, H.; Kondo, Y. Facile and selective cleavage of allyl ethers based on palladium(0)-catalyzed allylic alkylation of *N,N*-dimethylbarbituric acid. *Synlett*. **2003**, 1061-1063.
74. Luscombe, C. K.; Proemmel, S.; Huck, W. T. S.; Holmes, A. B.; Fukushima, H. Synthesis of supercritical carbon dioxide soluble perfluorinated dendrons for surface modification. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5505-5513.
75. Rao, M. S. C.; Rao, G. S. K. Benzannulation of cyclopentanone, cyclohexanone and cycloheptanone: a short synthesis of indan-5-carboxaldehyde, a monoterpene constituent of ammonium medium. *Ind. J. Chem., Sect. B* **1988**, *27B*, 660-661.
76. Sormunen, G. J.; Lewis, D. E. A rapid and convenient synthesis of homoallylic alcohols by the Barbier-Grignard reaction. *Synth. Commun.* **2004**, *34*, 3473-3480.

77. Picraux, L. B.; Smeigh, A. L.; Guo, D.; McCusker, J. K. Intramolecular energy transfer involving Heisenberg spin-coupled dinuclear iron-oxo complexes. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7846-7859.
78. Colomer, R.; Puig, T.; Brunet, J.; Lopez-Rodriguez, M. L.; Benhamu, B.; Ortega-Gutierrez, S.; Turrado, C. Preparation of polyhydroxylated compounds as fatty acid synthase (FASN) inhibitors. WO2009000864A1.
79. Puig, T.; Turrado, C.; Benhamu, B.; Aguilar, H.; Relat, J.; Ortega-Gutierrez, S.; Casals, G.; Marrero, P. F.; Urruticoechea, A.; Haro, D.; Lopez-Rodriguez, M. L.; Colomer, R. Novel inhibitors of fatty acid synthase with anticancer activity. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7608-7615.
80. Turrado, C.; Puig, T.; Garcia-Carceles, J.; Artola, M.; Benhamu, B.; Ortega-Gutierrez, S.; Relat, J.; Oliveras, G.; Blancafort, A.; Haro, D.; Marrero, P. F.; Colomer, R.; Lopez-Rodriguez, M. L. New synthetic inhibitors of fatty acid synthase with anticancer activity. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5013-5023.
81. Puig, T.; Vazquez-Martin, A.; Relat, J.; Petriz, J.; Menendez, J. A.; Porta, R.; Casals, G.; Marrero, P. F.; Haro, D.; Brunet, J.; Colomer, R. Fatty acid metabolism in breast cancer cells: differential inhibitory effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and C75. *Breast Cancer Res. Treat.* **2008**, *109*, 471-479.
82. Gibaldi, M.; Perrier, D. *Farmacocinética*. 1^a ed.; Reverté D.L.: Barcelona, 1982.
83. Tsang, R. Y.; Finn, R. S. Beyond trastuzumab: novel therapeutic strategies in HER2-positive metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 6-13.
84. Rexer, B. N.; Arteaga, C. L. Intrinsic and acquired resistance to HER2-targeted therapies in HER2 gene-amplified breast cancer: mechanisms and clinical implications. *Crit. Rev. Oncol.* **2012**, *17*, 1-16.
85. Puig, T.; Aguilar, H.; Cufi, S.; Oliveras, G.; Turrado, C.; Ortega-Gutierrez, S.; Benhamu, B.; Lopez-Rodriguez, M. L.; Urruticoechea, A.; Colomer, R. A novel inhibitor of fatty acid synthase shows activity against HER2+ breast cancer xenografts and is active in anti-HER2 drug-resistant cell lines. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, R131.
86. Ren, Y.; Himmeldirk, K.; Chen, X. Synthesis and structure-activity relationship study of antidiabetic penta-O-galloyl-D-glucopyranose and its analogs. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2829-2837.

SUMMARY

NOVEL INHIBITORS OF FATTY ACID SYNTHASE (FASN): VALIDATION AS A NEW TERAPEUTIC TARGET FOR BREAST CANCER TREATMENT

1. Background

Cancer is a leading cause of death worldwide.¹ Fatty acid synthase (FASN) has recently emerged as a promising target for antitumor drug development, since it is highly expressed in breast carcinoma and other human cancers.² However, the pharmacological use of well-characterized inhibitors of FASN –natural compounds cerulenin and (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), and synthetic analogue C75 (Figure 1)– has been limited due to their chemical instability, poor bioavailability and/or undesirable body weight loss.³

2. Aims

The main objective of this research work is the development of new inhibitors of FASN for the treatment of breast cancer. Using as starting point the chemical structure of the natural polyphenol EGCG, a new class of compounds of general structure **I** has been designed (Figure 1) in which the chromane moiety has been replaced by a cyclic subunit (C.S.) and linked to two polyhydroxyphenyl rings by different spacers (X, Y). The overall objective has been addressed through the following steps: identification of hit(s); hit to lead process; biological characterization of the lead(s), toxicity and pharmacokinetic studies; and determination of their antitumor efficacy.

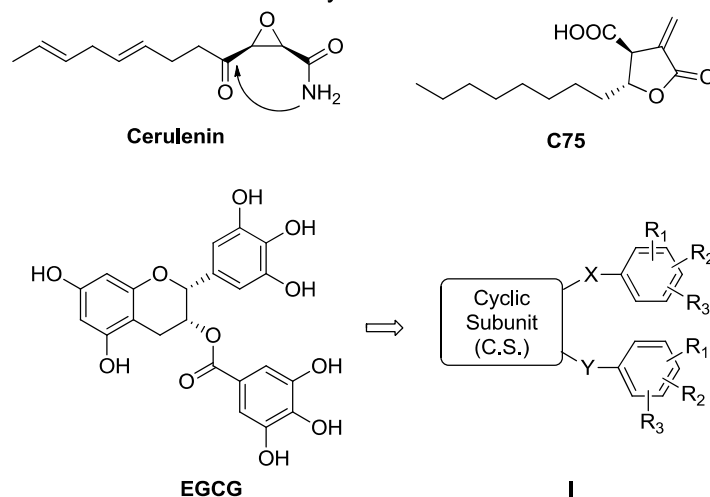


Figure 1. Reported FASN inhibitors cerulenin, C75 and (-)-epigallocatechin 3-gallate (EGCG), and new compounds **I**.

3. Results and discussion

In the search of new FASN inhibitors, a small series of compounds **I** (**1-4**) was initially synthesized (Figure 2), containing aliphatic or aromatic cyclic subunits (C.S.), substituted with two gallate groups (3,4,5-trihydroxybenzoyloxy radical). Compounds **3** and **4** were identified as new hits showing a moderate cytotoxic activity in SK-Br3 cells (IC_{50} = 125 and 76 μ M, respectively) and a significant reduction of the enzymatic activity of FASN (21 and 31%, respectively).⁴

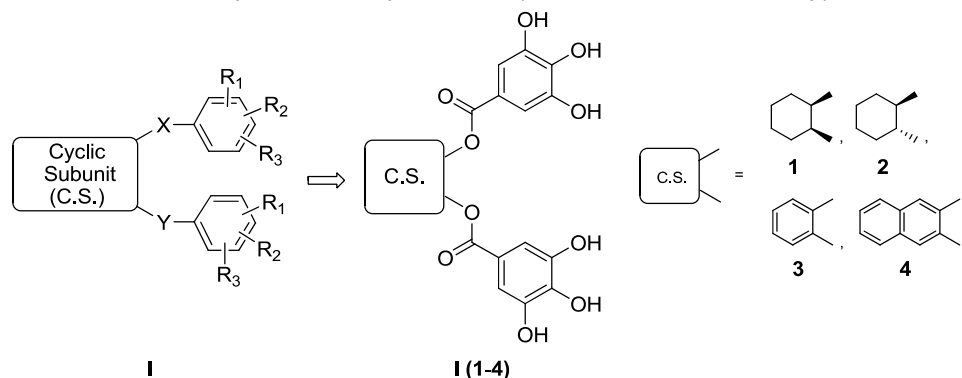


Figure 2. Search of hits: initial series of compounds of general structure **I**.

In this new class of FASN inhibitors, we carried out an extensive hit to lead process considering structural modifications of the cyclic subunit (C.S.), the spacer (X, Y), and the number and position of the hydroxy groups (R_1 - R_3), as detailed in Figure 3. Briefly, the optimized moieties were found to be C.S. = 1,3-naphthalenediyl, 1,4-naphthalenediyl and 1,1'-biphenyl-4,4'-diyl, $X = Y = OCO$, and R_1 - R_3 = 3,4,5-OH. Thus, leads **52** [IC_{50} (SK-Br3) = 21 μ M, FASN inh. = 90%], **53** [IC_{50} (SK-Br3) = 29 μ M, FASN inh. = 69%] and **61** [IC_{50} (SK-Br3) = 21 μ M, FASN inh. = 90%] were selected for further pharmacological characterization (Figure 3).^{5,6}

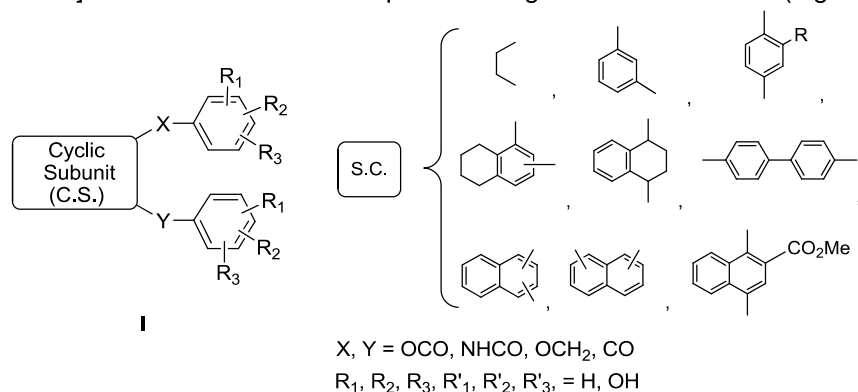


Figure 3. Hit to lead process.

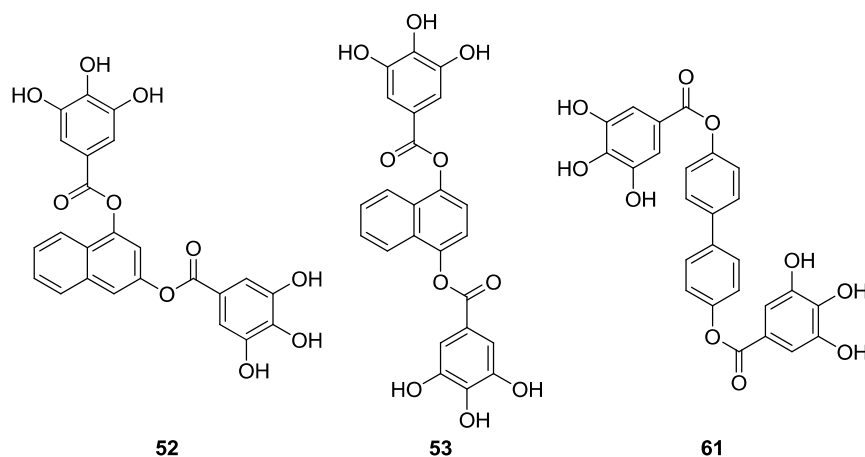


Figure 4. Selected lead compounds.

First, the actual contribution of FASN to the observed cytotoxic effects was studied. Thus, the FASN expression was knocked down in SK-Br3 cells using a FASN specific siRNA and cellular viability was determined in parallel for transfected and nontransfected cells. The results show that decreasing FASN expression in an 80% (quantified by Western blot band intensity densitometry) eliminates the cytotoxicity of compounds **52**, **53** and **61** (results obtained for **61** are shown in Figure 5), which did not induce any significant cell death up to a concentration of 10 μ M

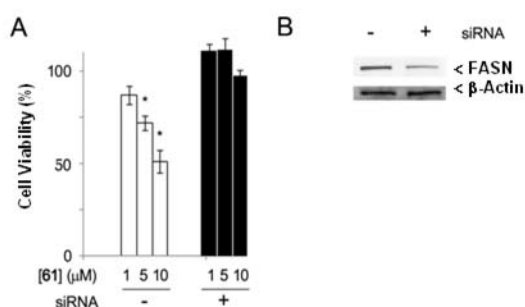


Figure 5. Contribution of FASN to the observed cytotoxic effects.

The capacity of the leads to induce cytotoxicity was further evaluated in a panel comprising a variety of tumor cells of different tissue origins, including colon, pancreas, skin, liver, ovary, breast, and lung. In general, cancer cells with high FASN levels are more sensitive to compounds **52**, **53** and **61**. Lower FASN levels decrease the sensitivity of cells toward the compounds.

These results prompted us to gain insights on the cell death mechanism and molecular pathways involved in this effect. Compounds **52**, **53** and **61** induced apoptosis as assessed by PARP cleavage (note intact PARP at 116 kDa and its cleavage product at 89 kDa), and block the activation of HER2, AKT, and ERK1/2 signaling pathways (Figure 6).

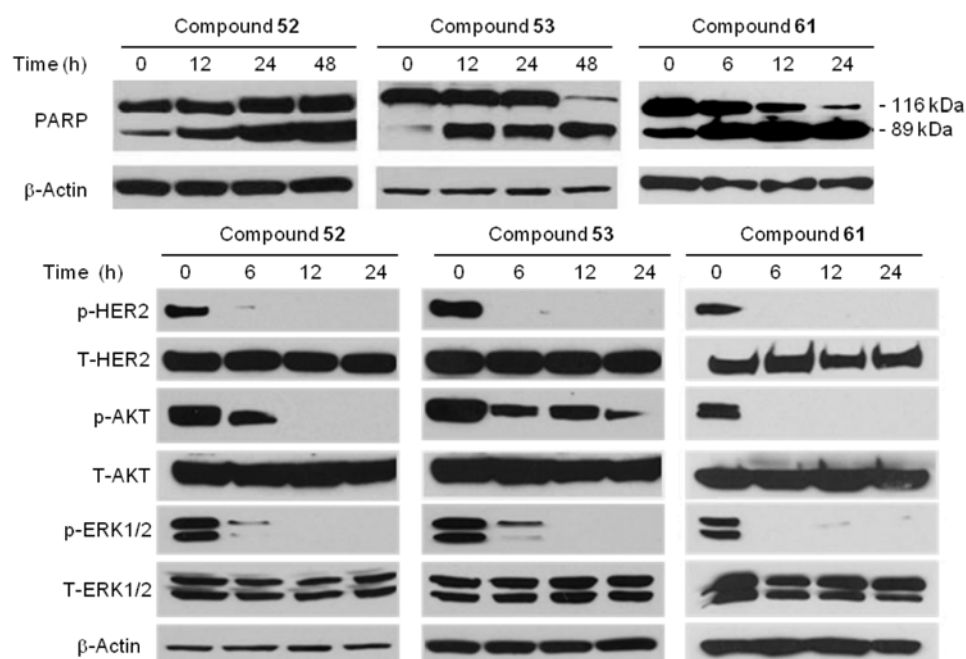


Figure 6. Cell death mechanism and signaling pathways.

Given the importance of inhibition of FASN without a cross-activation of CPT-1, which is relevant to avoid the side effect of weight loss, lead compounds were analyzed both in vitro and in mice. Importantly, derivatives **52**, **53** and **61** did not stimulate CPT-1 activity (Figure 7A), in a similar manner to what had been previously described for the natural FASN inhibitor EGCG and in sharp contrast to C75 which, as previously reported, produced a significant activation of CPT-1 activity. Consistent with these in vitro results, healthy mice treated with a single intraperitoneal (ip) dose of 30 mg/Kg of the new inhibitors did not show any significant weight loss vs the control group (Figure 7B).

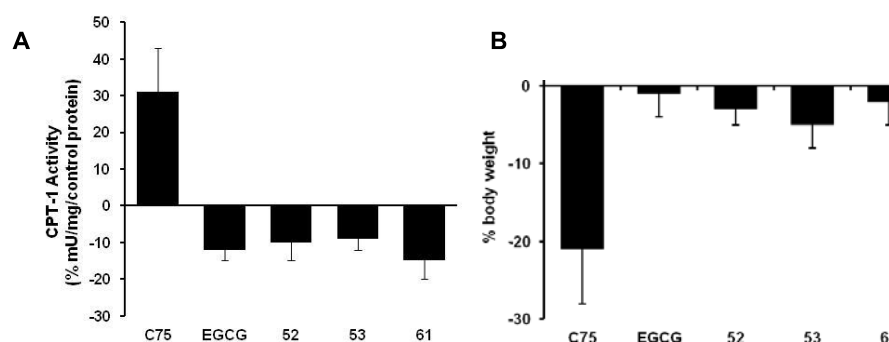


Figure 7. Effects of the new FASN inhibitors **52**, **53** and **61** in CPT-1 enzyme activity (A) and mice weight (B).

The next step was the study of the toxicity and the pharmacokinetic profile of the new FASN inhibitors. The ip administration of different doses (25-75 mg/Kg) of derivatives **52**, **53** and **61** during 15 days to healthy mice did not induce hepatic, renal or hematologic toxicity. Furthermore, the administration of compounds **52** and **61** did not induce weight loss to the treated animals, whereas analogue **53** induced a significant weight loss at 75 mg/Kg. These results prompted us to stop the development of compound **53**. On the other hand, compounds **52** and **61** displayed reasonable half-life times in human serum ($t_{1/2} \approx 2$ h) and moderate values in mouse serum, being significantly more stable than the natural inhibitor EGCG. Complete in vivo pharmacokinetic studies for derivative **52** supported its suitability for preliminary efficacy studies in breast cancer models.

The efficacy of **52** was studied in two models of breast cancer: in vivo in a xenograft model and in vitro in tumor cells with acquired resistance to anti-HER2 drugs. Obtained results in the xenograft model indicate that compound **52** (Figure 8) blocked tumor growth. Interestingly, in trastuzumab-resistant and lapatinib-resistant breast cancer cells, in which trastuzumab and lapatinib were not effective, new compound **52** retained the anticancer activity observed in parental cells.

Taken together, these data suggest that inhibiting FASN activity may represent a new therapeutic strategy for the treatment of breast carcinomas with acquired resistance to anti-HER2 therapies in current clinical use.⁷

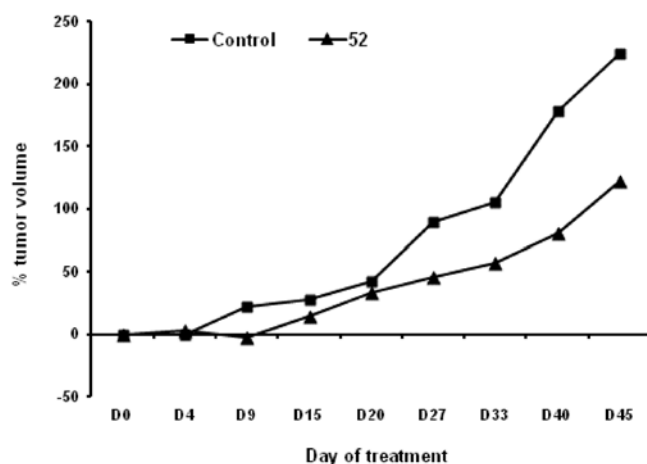


Figure 8. Decrease in tumor volume induced by the new FASN inhibitor **52** in a breast cancer xenograft.

4. Bibliography

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
2. Flavin, R.; Peluso, S.; Nguyen, P. L.; Loda, M. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol.* **2010**, *6*, 551-562.
3. Abramson, H. N. The lipogenesis pathway as a cancer target. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5615-5638.
4. Puig, T.; Turrado, C.; Benhamu, B.; Aguilar, H.; Relat, J.; Ortega-Gutierrez, S.; Casals, G.; Marrero, P. F.; Urruticoechea, A.; Haro, D.; Lopez-Rodriguez, M. L.; Colomer, R. Novel inhibitors of fatty acid synthase with anticancer activity. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7608-7615.
5. Colomer, R.; Puig, T.; Brunet, J.; Lopez-Rodriguez, M. L.; Benhamu, B.; Ortega-Gutierrez, S.; Turrado, C. Preparation of polyhydroxylated compounds as fatty acid synthase (FASN) inhibitors, WO2009000864A1.
6. Turrado, C.; Puig, T.; Garcia-Carceles, J.; Artola, M.; Benhamu, B.; Ortega-Gutierrez, S.; Relat, J.; Oliveras, G.; Blancafort, A.; Haro, D.; Marrero, P. F.; Colomer, R.; Lopez-Rodriguez, M. L. New synthetic inhibitors of Fatty Acid Synthase with anticancer activity. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5013-5023.
7. Puig, T.; Aguilar, H.; Cufi, S.; Oliveras, G.; Turrado, C.; Ortega-Gutierrez, S.; Benhamu, B.; Lopez-Rodriguez, M. L.; Urruticoechea, A.; Colomer, R. A novel inhibitor of fatty acid synthase shows activity against HER2+ breast cancer xenografts and is active in anti-HER2 drug-resistant cell lines. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, R131.

Análisis por HPLC-MS de la pureza de los compuestos finales.

Compuesto	Fórmula Molecular	MS(ESI) ([M-H] ⁻ , m/z)	Tiempo de retención (t _R , min)	Método
1	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀	418.6	20.18	B
2	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀	418.6	19.87	B
3	C ₂₀ H ₁₄ O ₁₀	412.5	18.77	B
4	C ₂₄ H ₁₆ O ₁₀	463.0	16.43	A
41	C ₂₀ H ₁₄ O ₁₀	412.5	19.14	B
42	C ₂₀ H ₁₄ O ₁₀	412.5	18.83	B
43	C ₂₁ H ₁₆ O ₁₀	427.0	14.14	A
44	C ₂₆ H ₁₈ O ₁₀	489.0	15.83	A
45	C ₂₂ H ₁₆ O ₁₂	470.9	12.79	A
46	C ₂₁ H ₁₆ O ₁₁	443.0	13.49	A
47	C ₂₄ H ₂₀ O ₁₀	467.0	15.65	A
48	C ₂₄ H ₂₀ O ₁₀	467.0	14.38	A
49	C ₂₄ H ₂₀ O ₁₀	467.1	16.83	B
50	C ₂₄ H ₂₀ O ₁₀	467.0	15.53	A
51	C ₂₄ H ₁₆ O ₁₀	463.0	15.45	A
52	C ₂₄ H ₁₆ O ₁₀	463.1	21.10	B
53	C ₂₄ H ₁₆ O ₁₀	463.0	14.94	A
54	C ₂₆ H ₁₈ O ₁₂	521.0	14.71	A
55	C ₂₄ H ₁₆ O ₁₀	463.0	14.76	A
56	C ₂₄ H ₁₆ O ₁₀	463.0	15.51	A
57	C ₂₄ H ₁₆ O ₁₀	463.0	15.94	A
58	C ₂₄ H ₁₆ O ₁₀	463.0	14.01	A
40	C ₁₆ H ₁₄ O ₁₀	365.0	12.42	A
59	C ₂₄ H ₁₆ O ₁₀	463.0	15.17	A
60	C ₂₄ H ₁₆ O ₁₀	463.1	21.06	B
61	C ₂₆ H ₂₀ O ₁₀	489.8	20.79	B
65	C ₂₆ H ₂₀ N ₂ O ₈	487.1	18.67	B
66	C ₂₄ H ₁₈ N ₂ O ₆	461.1	13.61	B
73	C ₂₆ H ₂₂ O ₈	461.0	18.54	B
83	C ₂₆ H ₁₈ O ₈	457.1	17.36	B
84	C ₂₄ H ₁₆ O ₈	431.1	16.57	B
91	C ₂₆ H ₁₈ O ₈	458.0	21.93	B
92	C ₂₆ H ₁₈ O ₈	458.1	22.32	B

Compuesto	Fórmula Molecular	MS(ESI) ([M-H] ⁻ , m/z)	Tiempo de retención (t _R , min)	Método
93	C ₂₄ H ₁₆ O ₈	431.0	19.32	B
94	C ₂₄ H ₁₆ O ₈	431.0	18.75	B
110	C ₂₆ H ₁₈ O ₉	474.0	21.09	B
111	C ₂₆ H ₁₈ O ₉	474.0	21.60	B
112	C ₂₆ H ₁₈ O ₈	458.0	22.16	B
113	C ₂₄ H ₁₆ O ₉	447.1	21.17	B
114	C ₂₄ H ₁₆ O ₉	447.0	17.59	B
115	C ₂₄ H ₁₆ O ₈	431.0	19.10	B
116	C ₂₄ H ₁₆ O ₉	447.1	21.15	B
117	C ₂₄ H ₁₆ O ₉	447.0	17.58	B
118	C ₂₄ H ₁₆ O ₈	431.0	18.57	B

Las fases móviles empleadas en el HPLC fueron A (95:5 agua:metanol) y B (5:95 agua:metanol), ambas fases contienen un 0.1% de hidróxido amónico y un 0.1% de ácido fórmico. Para la elución de los compuestos se usaron los dos gradientes que se describen a continuación.

Método A:		Método B:	
Tiempo / min	% de B	Tiempo / min	% de B
0	0	0	0
2	0	5	0
8	60	20	100
20	100	25	100
30	0	30	0